

УНИВЕРЗИТЕТ "СВ.КИРИЛ И МЕТОДИЈ"- СКОПЈЕ
МЕДИЦИНСКИ ФАКУЛТЕТ - СКОПЈЕ

Васо Талески

ИМУНОЕНЗИМСКИ МЕТОД (ELISA) И ПОЛИМЕРАЗА
ВЕРИЖНА РЕАКЦИЈА (PCR) ВО ДИЈАГНОСТИКАТА НА
ХУМАНАТА БРУЦЕЛОЗА

- докторска дисертација -

Скопје, 2001 година

Ментор

Академик проф. д-р Ѓорѓи Ефремов

Македонска академија на науките и уметностите – Скопје

I'm a slow walker but I never walk back.
(Јас одам бавно но никогаши не чекорам назад)

Abraham Lincoln

Long is the road from conception to completion.
(Долг е патиот од идеја до реализација)
Moli'ere

I am not young enough to know everything.
(Не сум доволно млад да знам сè)
Oscar Wilde

*Со голема благодарност за поддршката, разбирањето
и трпението во текот на повеќегодишната работа,
трудот го посветувам на:
Соња, Јасна и Бојан.*

БЛАГОДАРНОСТ

Со најголема љубов и задоволство, сакам да искажам голема благодарност за непроценливата помош од страна на сите кои ми помогнаа во изработката на оваа докторска дисертација:

- **Академик проф. д-р Ѓорѓи Ефремов**, заради безрезервно укажаната чест и доверба да ми биде ментор и заради непроценливите совети и суштински во обликувањето на дисертацијата,
- **Проф. д-р Боровоје Соколовски**, мојот прв училец и ментор, кој ми ја всади желбата за продолжување и продолбочување на неговото дело од областа на проучување на бруцелозата. Верувам дека резултатите од оваа дисертација ќе ги примени со најголемо задоволство и возбуда,
- **Полк. д-р Тед Хадфилд (Col. Ted Hadfield, PhD)**, кој ми овозможи престој, усовршување и изработка на најголемиот дел од дисертацијата (PCR, изолација и идентификација на бруцелиите) во Институтот за патолозија на армијата на САД во Вашингтон-ДЦ (AFIP-Washington DC, USA), и ми овозможи користење на RAPID PCR во мојата лабораторија во ЦВЗУ,
- **Доц. д-р Кака Појовска-Јовановска**, Институт за микробиологија и паразитологија, Медицински факултет-Скопје, претседател на рецензентската комисија, заради важните забелешки и суштинските, кои многу ми помогнаа во завршната изработка на дисертацијата,
- Управата на ЦВЗУ Скопје (полк. прим. д-р Аврам Ванковски, полк. проф. д-р Блаже Николовски, полк. д-р Крсто Блажевски, полк. д-р Боровоје Димитровски, полк. д-р Наум Наумовски),
- **Проф. д-р Никола Пановски и проф. д-р Милена Пејровска** (Институт за микробиологија и паразитологија, Медицински факултет-Скопје),
- **Проф. д-р Димитар Димитриев**, Клиника за инфективни болести-Скопје,
- **Проф. д-р Јован Бошњакоски**, Ветеринарен институт-Скопје,
- **Д-р Синиша Стојкоски, д-р Ефтим Штојковски, д-р Александар Ангелевски, д-р Јонче Атанасовски, прим. д-р Милка Камчева, прим. д-р Љиљана Кривева, д-р Велик Грков, д-р Александра Србиновска, прим. д-р Кашерина Манчева, д-р Трајко Тавчиоски, прим. д-р Блаже Алексоски, д-р Тајјана Мурџоска, д-р Елена Богоевска-Милоскоска, д-р Веле Пејровски, д-р Драшко Насоски, д-р Борче Зафировски, д-р Марјан Жежоски, прим. д-р Оља Николовска, д-р Елизабета Кривева** и лаборантите **Даринка Пеширски**.

СОДРЖИНА

	страна
• ЛИСТА НА КРАТЕНКИ -----	11
• ИЗВАДОК (на македонски јазик) -----	13
• ИЗВАДОК (на англиски јазик) -----	15
1. ВОВЕД	
1.1. ПОИМ -----	17
1.2. ИСТОРИЈАТ-----	18
1.3. ГЕОГРАФСКА ДИСТРИБУЦИЈА-----	18
1.4. МОРФОЛОГИЈА -----	18
1.5. КУЛТУРЕЛНИ ОСОБИНИ -----	18
1.6. КЛАСИФИКАЦИЈА И ТИПИЗАЦИЈА НА РОДОТ <i>Brucella</i> -----	20
1.7. СТРУКТУРА НА КЛЕТОЧНИТЕ МЕМБРАНИ -----	23
А. Внатрешната (цитоплазматска) мембрана -----	23
Б. Клеточен ѕид -----	24
1. Пептидогликан (Мукопептид, Murein)-----	24
2. Периплазматски простор-----	24
3. Надворешна мембрана -----	24
1.8. АНТИГЕНСКА ГРАДБА -----	26
А. Антигени на надворшната мембрана -----	26
Б. Периплазматски протеини -----	27
В. Цитоплазматски протеини -----	28
1.9. ГЕНЕТИКА -----	28
1.10. ОСЕТЛИВОСТ -----	28

А. Осетливост кон физички агенси -----	30
Б. Осетливост кон хемиски агенси -----	30
В. Осетливост кон бои -----	30
Г. Осетливост кон антибиотици -----	30
1.11. ЕПИДЕМИОЛОГИЈА -----	30
1.11.1. Распространетост -----	30
1.11.2. Резервоар и извор на зараза -----	31
1.11.3. Патишта на пренос -----	32
1.11.4. Сезона на заболувањето -----	33
1.11.5. Значење на професијата, пол, возраст и место на живеење -----	33
1.12. ПАТОГЕНЕЗА -----	33
1.13. ИМУН ОДГОВОР -----	34
А. Целуларен имун одговор -----	35
Б. Хуморален имун одговор -----	36
1.14. КЛИНИЧКА СЛИКА И ТЕК НА БОЛЕСТА -----	36
А. Акутен тек на болеста -----	37
Б. Хроничен тек на болеста -----	38
В. Компликации -----	38
Г. Прогноза -----	38
1.15. ДИЈАГНОЗА -----	38
1.15.1. Бактериолошка дијагноза -----	39
1.15.2. Серолошка дијагноза -----	40
А. Аглутинарачки тестови -----	41
Б. Реакција на врзување на комплемент -----	41
1.16. ТЕРАПИЈА -----	42
1.17. ЕРАДИКАЦИЈА И ПРЕВЕНЦИЈА -----	44
2. МОТИВ ЗА ИЗРАБОТКА НА ДИСЕРТАЦИЈАТА -----	46

3. ЦЕЛИ НА ИСПИТУВАЊЕТО	47
4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ	48
4.1. МАТЕРИЈАЛ	48
4.1.1. Серуми	48
4.1.2. Крв за PCR	48
4.1.3. Прајмери и проби во RAPID PCR	49
4.2. МЕТОДИ	50
4.2.1. Стандардни серолошки методи	50
4.2.1.1. Тест на брза аглутинација на плочка (RBT, BAV-тест)	50
4.2.1.2. Реакција на бавна аглутинација во епрувети (Wright)	51
4.2.1.3. Антихуман глобулински тест (Coombs)	52
4.2.2. ELISA	52
4.2.2.1. Принцип на работа	52
4.2.2.2. Подготовка на реагенсите и серумите	53
4.2.2.3. Изведување на тестот	53
4.2.2.4. Интерпретација на резултатите	54
4.2.3. PCR	55
4.2.3.1. Екстракција на DNA	57
4.2.3.1.1. Лиза на крвни клетки и бактерии	57
4.2.3.1.2. Преципитација на протеините	58
4.2.3.1.3. DNA преципитација	58
4.2.3.1.4. DNA хидратација	59
4.2.3.2. Подготовка на Master Mix	59
4.2.3.3. Изведување на PCR	59
4.2.4. КУЛТИВИРАЊЕ	60
4.2.5. СТАТИСТИЧКА ОБРАБОТКА	61

5. РЕЗУЛТАТИ	62
5.1. РЕЗУЛТАТИ ОД СЕРОЛОШКИТЕ РЕАКЦИИ	62
5.1.1. Резултати од серолошките реакции кај лица со акутна бруцелоза	62
5.1.1.1. Серолошки резултати при прием во болница	62
5.1.1.2. Серолошки резултати по завршеток на лекување	64
5.1.1.3. Серолошки резултати 3 месеци по завршеток на лекување	65
5.1.1.4. Серолошки резултати 6 месеци по завршеток на лекување	67
5.1.2. Резултати од серолошките реакции кај лица лекувани од бруцелоза со продолжителни симптоми	68
5.1.3. Резултати од серолошките реакции кај лица лекувани од бруцелоза без симптоми	71
5.1.4. Резултати од серолошките реакции кај здрави доброволни крводарители	74
5.2. РЕЗУЛТАТИ ОД PCR	75
5.2.1. PCR резултати кај болни со акутна бруцелоза	75
5.2.2. PCR резултати кај лица лекувани од бруцелоза, со продолжителни симптоми	77
5.2.3. PCR резултати кај лица лекувани од бруцелоза без симптоми	79
5.2.4. PCR резултати кај здрави лица	80
5.2.5. PCR резултати кај чисти култури на <i>Brucella</i>	80
6. ДИСКУСИЈА	81
6.1. СЕРОЛОШКИ ИСПИТУВАЊА	81
6.1.1. Серолошки резултати кај болни со акутна бруцелоза	84
6.1.1.1. Сензитивност и специфичност	84
6.1.1.2. Прогностичка (предиктивна) вредност	85
6.1.2. Серолошки резултати кај лекувани болни со симптоми	85
6.1.3. Серолошки резултати кај лекувани болни без симптоми	86
6.1.4. Серолошки резултати кај здрави крводарители	86
6.1.5. Репродуктибилност	86

6.2. PCR-----	88
6.2.1. PCR резултати кај болни со акутна бруцелоза-----	92
6.2.2. PCR резултати кај лица лекувани од бруцелоза со продолжителни симптоми-----	93
6.2.3. PCR резултати кај лица лекувани од бруцелоза без симптоми--	94
6.2.4. PCR резултати кај здрави лица-----	94
6.2.5. Сензитивност и специфичност на PCR-----	94
7. ЗАКЛУЧОЦИ-----	97
8. ЛИТЕРАТУРА-----	99
9-10. ПРИЛОЗИ-----	114
9.1. ELISA наоди за IgM антитела-----	115
9.2. ELISA наоди за IgG антитела-----	116
10.3. Подготовка на PCR Master Mix-----	117
10.4. Табеларен приказ на PCR наоди-----	118
10.5. Приказ на PCR позитивни контроли и добиени резултати-----	119
10.6. Мониторинг на флуоресценцијата кај RAPID PCR-----	120

ЛИСТА НА КРАТЕНКИ

- **A (a)** – adenine
- **BAВ тест** – тест на брза аглутинација на плочка
- **BCSP31** – ген кој кодира 31- килодалтински надворешен мембрански протеин (31 kDa OMP)
- **bp** – базни парови
- **C (c)** – cytosine
- **CD4+** – Th1, помошнички (helper) лимфоцит-Т
- **CD8+** – Тс- цитотоксичен лимфоцит-Т
- **CDC** – Center for Disease Control and Prevention, Atlanta, USA
- **Coombs** – антихуман глобулински тест
- **DNA** – дезоксирибонуклеинска киселина
- **ELISA** – Enzyme Linked Immunosorbent Assay
- **G (g)** – guanine
- χ^2 – Хи квадрат тест
- **IFN (α, β, γ)** – интерферони (α, β, γ)
- **IL (1-12)** – интерлеукини (1-12)
- **IS711 (IS6501)** – инсерциска секвенца *IS711*
- **kDa** – килодалтони
- **ЛН** – лажно негативни резултати кај болни
- **ЛП** – лажно позитивни резултати кај здрави
- **LPS** –липополисахарид
- **Ly-T** – Т-лимфоцити
-

- **Mabs** – моноклонски антители
- **ОД** – оптички дензитет
- **ОМР** – надворешен мембрански протеин
- **p** – статистичка сигнификантност кај χ^2 -тестот
- **PCR** – Polymerase Chain Reaction
- **PG** – пептидогликан
- **ПВ⁺** – прогностичка (предиктивна) вредност на позитивни наоди
- **ПВ⁻** – прогностичка (предиктивна) вредност на негативни наоди
- **ПМК** – полиморфонуклеарни клетки
- **RAPID** – Ruggedized Advanced Pathogen Identification Device
- **RBT** – Rose Bengal Test
- **РВК** – реакција на врзување на комплемент
- **СД** – стандардна девијација
- **СС** – степен на слобода
- **T(t)** – tyamine
- **ТМВ** – хромоген субстрат (3,3',5,5'-tetra-methyl-benzidine)
- **ВН** – вистински негативни резултати кај здрави
- **ВП** – вистински позитивни резултати кај болни
- **WHO** – Светска здравствена организација
- **Wright** – Реакција на бавна аглутинација во епрувети

"ИМУНОЕНЗИМСКИ МЕТОД (ELISA) И ПОЛИМЕРАЗА ВЕРИЖНА РЕАКЦИЈА (PCR) ВО ДИЈАГНОСТИКАТА НА ХУМАНАТА БРУЦЕЛОЗА"

Васо Талески

Универзитет "Св.Кирил и Методиј" - Скопје
Медицински факултет - Скопје
Докторска дисертација, 2001; 1-120

ИЗВАДОК

Во периодот од 1980 до 2000 година во Република Македонија се регистрирани вкупно 8.229 случаи на хумана бруцелоза, од кои во последните шест години (1995-2000) околу 3.500. Во лабораториите низ Републиката најчесто користени серолошки тестови се ВAB, Wright и Coombs но со нив не може да се утврди кои антитела (IgM и/или IgG) се присутни во серумот, а со тоа ни фазата на болеста како и одговорот на антибиотскиот третман.

Цел на испитувањето е унапредување и комплетирање на дијагностиката на хуманата бруцелоза во Република Македонија со воведување на ELISA и PCR во рутинската дијагностика.

Испитувањата се спроведени во текот на 1997-2000 година.

Со серолошки реакции испитани се вкупно 1.100 серуми, и тоа: 1. од 100 болни во акутна фаза на болеста, 400 серуми по еден примерок при: а) приемот во болница, б) по завршетокот на лекувањето, в) по три и г) шест месеци од лекувањето, 2. од 100 лица лекувани од бруцелоза, со продолжителни симптоми, 200 серуми, по два примерока на растојание од шест месеци, 3. од 100 лица лекувани од бруцелоза, без симптоми, 200 серуми, по два на растојание од шест месеци, 4. од 300 здрави, доброволни крводарители, 300 серуми, по еден серум од секој. Истовремено, од истите лица е земен по еден примерок крв за PCR од: 100 болни со акутна бруцелоза, 100 лица лекувани од бруцелоза со продолжителни симптоми, 100 лица лекувани од бруцелоза без симптоми, и од 30 здрави лица.

За одредување на IgM и IgG *brucella* антитела во серумот на пациентите со ELISA, користени се микроплочи и реагенси на NOVUM Diagnostica и ELISA Tecan-Clasic.

Амплификација е вршена со RAPIDTM PCR при што се користени прајмери и проби за детекција на *Brucella melitensis* гените IS711 и BCSP31. PCR е изведувана како "two step" PCR: 1. на 94°C/2min (еден циклус), 2. на 60°C/20 sec. и 94°C/0sec. (40 циклуси).

Добиена е сензитивност на ELISA методот од 98% што е статистички значајно повисока во однос на Wright (82%) и Coombs (89%). Не е добиена

разлика во специфичноста на ELISA, Wright и Coombs (100% кај сите тестови).

Позитивните (ПВ⁺) и негативните (ПВ⁻) прогностички вредности кај ELISA (ПВ⁺ 98% и ПВ⁻ 98%) се статистички значително повисоки во однос на Wright (ПВ⁺ 82% и ПВ⁻ 84,7%) и Coombs (ПВ⁺ 89% и ПВ⁻ 90%).

Резултатите добиени со ELISA се високо репродуцибилни, методот е економичен и се изведува за кусо време. Заради наброените предности ELISA треба да биде референтен метод во серолошка дијагностика на хуманата бруцелоза.

Во PCR испитувањата, од тестираните прајмери, подобар пар за RAPID PCR, беа прајмерите за утврдување на генот *BCSP31*, кој го кодира 31kDa (OMP) надворешниот мембрански протеин на *Brucella melitensis*, со сензитивност од 56%, специфичност од 100%, позитивна прогностичка вредност од 100%, негативна прогностичка вредност од 40,5% и лимит на детекција од 100fg DNA. Сензитивноста кај примероците на периферна крв земани во почетокот на болеста, кога бактериемијата била сè уште присутна, е значително повисока.

Од 90 култивирани примероци на полиморфонуклеарни клетки добиени се 16 изолати на *Brucella melitensis*. Сите изолати беа потврдени и со PCR во време од 30 мин. Утврдувањето на *brucella DNA* со PCR од култури и хемокултури се изведува побрзо, поекономично е од стандардните методи на изолација и идентификација, и овозможува избегнување на ризикот за вработените од интралабораториски инфекции.

Рутинска примена на ELISA и PCR овозможува надминување на познатите проблеми во дијагностиката на хуманата бруцелоза и е значителна помош во лекувањето на болните и во текот на епидемиолошките студии.

КЛУЧНИ ЗБОРОВИ: Бруцелоза, ELISA, RAPID PCR, *IS711*, *BCSP31*, BAV, Wright, Coombs.

"ENZYME LINKED IMMUNOSORBENT ASSAY (ELISA) AND POLIMERASE CHAIN REACTION (PCR) IN DIAGNOSIS OF HUMAN BRUCELLOSIS"

Vaso Taleski

University "St.Cyril and Methodius"-Skopje
Medical faculty-Skopje
Doctoral dissertation, 2001; 1-120

ABSTRACT

During the period 1980 to 2000 a total of 8.229 cases of human brucellosis were reported in the Republic of Macedonia, about 3.500 during the last six years (1995-2000). Mostly used serologic tests in the laboratories across the Republic are: BAB, Wright and Coombs, but they cannot distinguish which antibodies are present in the sera (IgM and/or IgG), therefore it's not possible to distinguish the phase of the disease and the response to antibiotic treatment.

The aim of this study is improving and completing the diagnosis of human brucellosis in the Republic of Macedonia, by establishing ELISA and PCR as routine diagnostic procedures.

The testing were done during 1997-2000.

A total of 1.100 sera were tested serologically: 1. From 100 patients in acute phase of disease 400 sera: a) 100 sera from patients when admitted at the hospitals, b) 100 sera after completing the treatment, c) 100 sera three months after treatment and d) 100 sera six months after treatment; 2. From 100 persons treated for brucellosis, with prolonged symptoms, 200 sera, two samples of each patient, within six months sampling distance; 3. From 100 persons treated for brucellosis, without symptoms, 200 sera, two samples of each patient, within six months sampling distance; 4. From 300 healthy blood donors, 300 sera, one sample from each person. Simultaneously, from the same persons, peripheral blood for PCR, one sample from each person, were collected, including: 100 patients in acute phase of disease, 100 patients previously treated for brucellosis, with prolonged symptoms, 100 patients previously treated for brucellosis, without symptoms, and 30 healthy persons.

To detect IgM and IgG *brucella* antibodies in patients sera by ELISA, a microplates and reagents from NOVUM Diagnostica and ELISA Tecan-Classic, were used.

PCR amplifications were made by The RAPIDTM-PCR. Primers and probes for *Brucella melitensis* genes *IS711* and *BCSP31* detection were used. Two steps PCR was used: 1. at 94⁰C for 2 min (one cycle), then 2. 40 cycles as follows: 60⁰C for 20 sec, 94⁰C for 0 sec.

ELISA method was found to have sensitivity of 98%, which was statistically significant higher then Wright test (82%), and Coombs test (89%). Statistical significant differences in specificity between ELISA, Wright and Coombs were not found (100% in all tests).

The positive (PV⁺) and negative (PV⁻) prognostic values of ELISA (PV⁺ 98% and PV⁻ 98%) were statistically higher than in Wright (PV⁺ 82% and PV⁻ 84,7%) and Coombs (PV⁺ 89% and PV⁻ 90%).

The ELISA results were highly reproducible, the method is economical, and takes short time to be performed. Due to all mentioned advantages compared with classical serological tests, ELISA should be a reference method in diagnosis of human brucellosis.

The primers for detecting the gen *BCSP31* that codes a 31kDa (OMP) outer membrane protein of *Brucella melitensis*, from tested primers, were better pair for RAPID PCR, with sensitivity of 56% and specificity of 100%, positive prognostic value of 100% and negative prognostic value of 40,5%, and limit of detection of 100 fg of DNA. The sensitivity was much higher for samples of peripheral blood obtained in the beginning of the disease, when the bacteriemia was still present.

A total of 16 isolates were obtained from 90 cultivated samples of 90 PMC (polymorphonuclear cells). All isolates were confirmed by PCR in 30 min. Determining the *brucella* DNA with RAPID PCR from cultures and hemocultures is faster, more economical than the standard methods of isolation and identification, and avoids the risk for employees from intralaboratory infections.

The possibility of routine use of ELISA and PCR, enables to overcome the well-known problems in diagnosis of human brucellosis and provides significant help in treatment of patients and during epidemiological studies.

KEY WORDS: Brucellosis, ELISA, RAPID PCR, *IS711*, *BCSP31*, BAB, Wright, Coombs.

1. ВОВЕД

1.1. Поим

Бруцелозата (*Brucellosis*, *Gastric intermitent fever*, *Febris undulans*, *Malta fever*, *Mediterran fever*, *Neapolitan fever*, *Melitococcosis*, *Texas fever*, *Rio Grande fever*, *Bang's disease*, *Febris melitensis*) е инфективно заболување од групата зоонози, причинета од бактерии од родот ***Brucella*** (FAO/WHO 1986; Sokolovski et al., 1999). Примарно заболуваат голем број домашни (овци, кози, говеда, коњи, камили, свињи, кучиња, мачки) и диви животни, кај кои се манифестира со пометнување на гравидните единки (Sokolovski et al., 1994). Под одредени услови болеста може да се пренесе од животните на луѓето. Родот ***Brucella*** врз основа на културелните, метаболните и антигенските карактеристики е поделен на шест видови: ***B. melitensis***, ***B. abortus***, ***B. suis***, ***B. ovis***, ***B. canis*** и ***Brucella neotomae*** (Corbel, 1984). Болест кај луѓето може да причинат: ***B. melitensis***, ***B. abortus***, ***B. suis*** и ***B. canis***. Полиморфизмот во клиничката слика причинува бројни потешкотии во поставувањето на дијагнозата и чести дијагностички грешки. Бруцелозата претставува ветеринарен, економски, епидемиолошки и здравствен проблем на земјите во развој (Matyas et al., 1984; FAO/WHO 1986), но и во светски размери (Salle, 1974), особено онаму каде сточарството е главна стопанска гранка (Alausa, 1980; Wkly Epid Rec, 1984; Madkour, 1985). Лесниот пренос на бруцелозата преку аеросоли ја чини да биде еден од кандидатите за употреба како биолошко оружје (Taleski, 1998). Во 1942 година САД започнале со развој на ваква програма. Бруцелите ги сместувале во бомби и ги тестирале во текот на 1944-1945 година. Од 1967 година САД ја напуштиле оваа програма како офанзивна, и од тогаш прават напори за развивање на одбрамбена програма заради загриженоста од можна употреба како биолошко оружје против нивните сили (Hoover et al., 1998; Eldridge, 1998).

1.2. Историјат. Родот ***Brucella*** има шест видови. ***B. melitensis*** е изолирана од слезина на војник умрен од *Malta Fever* во 1887 година на островот Малта (Bruce, 1887; Young et al., 1989; Brinley-Morgan et al., 1990).

Во 1897 година, во Копенхаген, *Bang* ја открил ***B. abortus*** кај болни крави кои имале инфективни пометнувања. Во 1914 година, *Traum* ја изолирал ***B. suis*** од фетус на свиња. *Buddle* и *Boyes* во 1953 година, на Нов Зеланд, ја

изолирале *B. ovis* од овци со заболувања на гениталиите. *B. neotomae* ја изолирале *Stoennner* и *Lackman* во 1957 година, во Јута (Utah), САД, од шумски стаорци. *B. canis* ја откриле *Carmichael* и *Bruner* во 1968 година, како причинител на абортуси кај кучки во САД (Brinley-Morgan et al., 1990). Болеста кај луѓето прв ја опишал Хипократ како нерегуларна, долготрајна фебрилна состојба, без кризи (Stitt, 1922; Vershilova et al., 1972), а англискиот лекар *Marston* во 1861 година прв ја издвојува како посебно заболување. *Marston* и самиот оболувајќи од бруцелоза, дал опис на клиничката слика и ја нарекол *Gastric intermitent fever* (Madkour, 1985; Brinley-Morgan et al., 1990).

1.3. Географска дистрибуција. Бруцелозата ја има во целиот свет, а особено во медитеранските земји и Африка (Matyas et al., 1984). Ја има и во Индија, Кина, Северна и Јужна Америка (Brinley-Morgan et al., 1990), каде најверојатно е пренесена од Медитеранот. Ризични фактори за појава на бруцелоза во Медитеранот се многубројни: голема густина на стадата кози и овци, голема мобилност заради барање пасишта, развиена трговија, чести контакти меѓу стадата на пасиштата и поилиштата (Mantovani et al., 1995).

1.4. Морфологија. Бруцелите се ситни, неподвижни, аеробни, аспорогени, без капсула, грам-негативни кокобацили или куси бацили (0,5 до 0,7 со 0,6 до 1,5 μm), распоредени поединечно, во парови или куси вериги (Drndarski, 1989).

1.5. Културелни особини. Сите видови бруцели се размножуваат во нормална атмосфера, освен *B. abortus* за која е потребно зголемено присуство на CO_2 (5-10%) особено при примарна изолација. Оптималната температура за размножување е 37°C (гранични температури од 22°C до 40°C), при рН 6,6-7,4. Култивирањето е можно само на збогатени посевки кои содржат аминокиселини, витамини (тиамин, ниацин, биотин) и минерали (Holt et al., 1994). Во плацентата на животните се создава *erythrol*, кој има специјално стимулирачко дејство за раст на бруцелите (Brinley-Morgan, 1990). Заради ова гравидните единки се многу осетливи и го пометнуваат плодот, што е и еден од првите знаци на појава на бруцелоза кај животните. За разлика од

животните, кај луѓето во плацентата нема *erythrol* и ваква осетливост, пометнување, не се јавува (Young, 1983a).

На површината на цврсти посежки колонии се појавуваат по инкубација од два дена. По четири дена колонии се 2-3 mm во пречник, нехемолитични, непигментирани, кружно-конвексни, со мазни, сјајни површини и јасни рабови слични на капки роса (Drndarski, 1989; Holt et al., 1994; Erski-Biljic et al., 1998). Колонии со ваков опис се во S-форма (S-smooth), при што имаат слаба синкаво-бела опалесценција при рефлектирачко светло, додека при трансмисивно светло тие се транспарентни со бледо жолта боја.

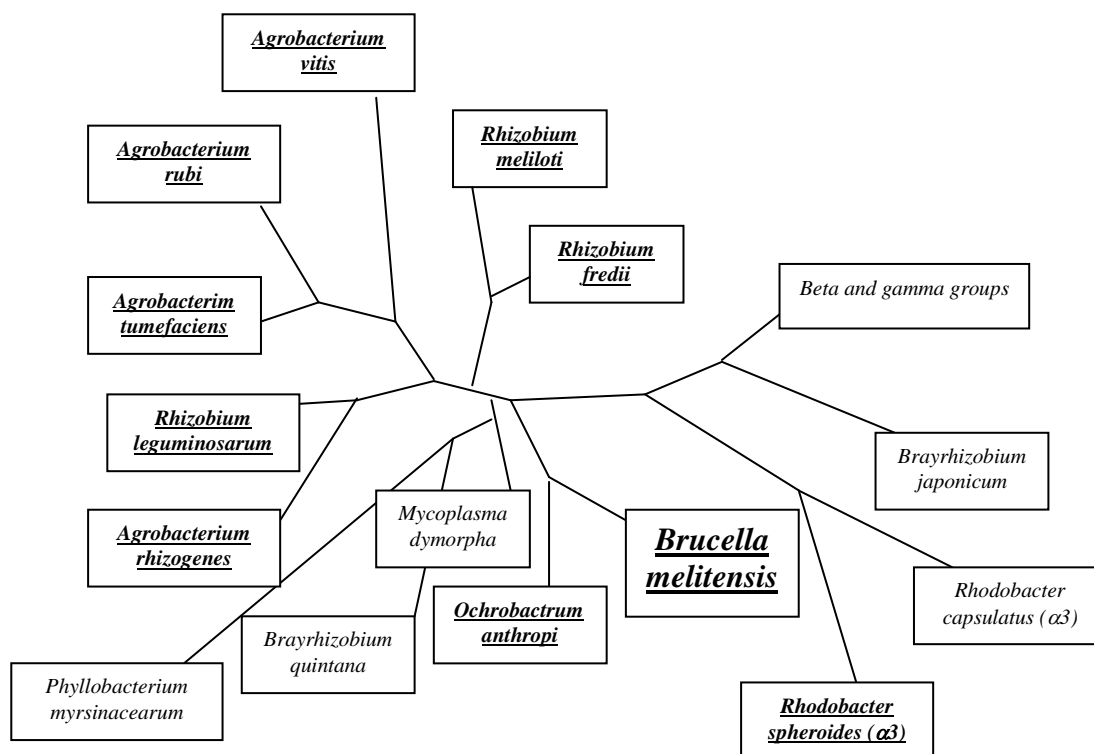
Други можни варијации на колонии се: R (R-rough)-рапави и матни и M (M-mucoid)-слизави при што бојата им варира од бела до кафеава при рефлекторно или трансмисивно светло. Ваквите колонии се обично транспарентни, но може да се и непрозрачни (opaque) (Mayer, 1990). Можни се и интермедиерните форми SI и I. Бруцелите во S-форма се вирулентни, а во R и M форма се слабо вирулентни или авирулентни (Holt et al., 1994; Mayer, 1990). Можно е спонтано преминување на колонии од S-форми во R-форми и обратно. Повеќето видови на родот *Brucella* растат оскудно во пептонски течен медиум и не можат да пораснат ако е мал инокулот, додека во пептони како Tryptase и Trypticase soya, со додавање на 1-5% серум, растот се подобрува. При пораст во течните посежки се јавува средна заматеност, слаб седимент и тенка мембрана (пеликула) на површината (Holt et al., 1994).

L-форми. Бруцелите се подложни на L-трансформација при експозиција на антибиотици или хемиски супстанции, како при експериментални услови така и за време на третман на пациентите. Морфологијата на клетките се менува во тек на процесот на L-трансформацијата и се карактеризира со хетероморфни форми: сферопласти од 1-15 μm , топчести клетки од 2-7 μm , големи тела до 50 μm , филаментозни структури и елементарни телца. L-формите се често самоаглутинабилни, но не аглутинараат во специфични антисеруми. Вирулентноста на L-формите опаѓа во текот на трансформацијата. Тие се обично во S-форма, и немаат липополисахариден ендотоксин, за разлика од клетките со интактни надворешни мембрани. Реверзија на L-формите понекогаш се јавува по пасажа *in vitro* или *in vivo*,

при што антигенската градба, вирулентноста и хемискиот состав обично не се целесно обновени како кај родителските соеви (WHO, 1986).

1.6. Класификација и типизација на родот *Brucella*

Сегашниот систем на таксономија на родот *Brucella* е врз основа на одредбите на Поткомитетот за таксономија на *Brucella* на Интернационалниот комитет за бактериолошка номенклатура од 1963 година, како и извештаите од 1975, 1982, 1984 и 1986 година (Holt et al., 1994; WHO, 1986; International Committee, 1986; 1988; Moyer et al., 1991). Бруцелите таксономски се сместени во α -2 подгрупата на класата *Proteobacteria*, слика 1 (Moreno et al., 1990; Jumas-Bilak et al., 1998; Gupta, 2000).

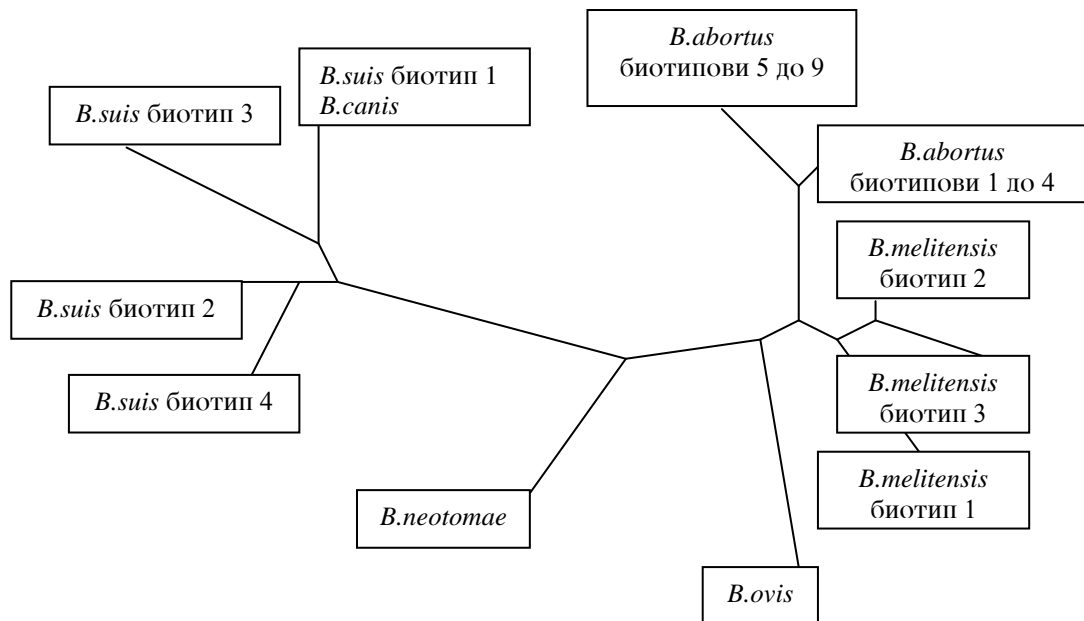


Слика 1. Филогенетско стебло на геномската организација на организмите што припаѓаат на α -2 подгрупата на класата *Proteobacteria* (плус *Rhodobacter species*, кој припаѓа на $\alpha 3$ подгрупа). Организмите со комплексни геноми се подвлечни (Moreno et al., 1990).

Со овие одредби е дефиниран **родот *Brucella*** и неговите шест видови и повеќе биотипови, слика 2 (Michaux-Charchon et al., 1997):

1. *Brucella melitensis* (со три биотипови: 1, 2, 3)

2. *Brucella abortus* (со осум биотипови : 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 9)
3. *Brucella suis* (со четири биотипови : 1, 2, 3, 4)
4. *Brucella ovis*
5. *Brucella neotomae*
6. *Brucella canis*



Слика 2. Филогенетско стебло на шесте видови *Brucella*

Сличностите на нуклеотидните секвенци меѓу сите шест видови бруцели, докажани со DNA-DNA хибридизација, се толку големи (96 +/- 4%), заради што Verger и соработниците (1985), следејќи ги интернационалните препораки за бактериска класификација, предлагаат родот да се смета за моноспецифичен, еден вид, кој би се нарекол *B. melitensis*, со повеќе под-видови (Corbel, 1991). Но и покрај ова, родот *Brucella* сè уште е поделен на шест видови, врз основа на различната вирулентност на секој од нив, иако вирулентноста како таксономски критериум не се зема предвид.

Референтни соеви и нивни биотипови се (Corbel, 1983):

- | | | |
|-------------------------|-----|----------|
| 1. <i>B. melitensis</i> | 16M | биотип 1 |
|-------------------------|-----|----------|

63/9	биотип 2
Ether	биотип 3

B. melitensis најчесто се среќава во земјите на Медитеранот и е нај-патогена за луѓето. Примарни домаќини се кози и овци. Како причинител на бруцелозата во Република Македонија е идентификуван биотип 2.

2. <i>B. abortus</i>	544	биотип 1
	86/8/59	биотип 2
	Tulya	биотип 3
	292	биотип 4
	B3196	биотип 5
	870	биотип 6
	63/75	биотип 7
	C68	биотип 9

B. abortus е помалку патогена за луѓето од *B. melitensis*. Примарни домаќини се говедата. Во различни земји се застапени различни биотипови.

3. <i>B. suis</i>	1330	биотип 1
	Thomsen	биотип 2
	686	биотип 3
	40	биотип 4

Биотиповите 1, 2 и 3 се патогени за свињи, а биотипот 4 за северни елени, карибуи и некои видови глодари. Биотипот 1 е типичен претставник. Биотипот 2 е помалку патоген за луѓето а биотипот 3 е најчесто изолиран во САД (Ray, 1979).

4. <i>B. ovis</i>	63/290	(нема биотипови)
5. <i>B. neotomae</i>	5K33	(нема биотипови)
6. <i>B. canis</i>	RM6/66	(нема биотипови)

Поткомитетот за таксономија на родот *Brucella* (Holt et al., 1994; WHO, 1986) препорачува покрај морфолошките, културелните, метаболичните и

серолошките особини, во идентификацијата на видовите и типовите да се користат следните тестови (Corbel, 1990):

- а) конвенционални тестови (потреба за CO₂, осетливост кон бои, произведување на H₂S, уреазна активност и аглутинација во моно-специфични серуми) и
- б) тестови на фаголиза.

При изолација на епидемиолошки значајни култури, како и за потврда на идентификацијата FAO/WHO, препорачуваат испраќање на културите во некој референтен центар на FAO/WHO*. Потврдни тестови се потребни и во случај на атипични изолати кои се вршат врз основа на:

- а) испитување на составот на DNA (односот на пуринските и пиримидинските бази, DNA-DNA хибридизација),
- **б) тестови за одредување на оксидативниот механизам и
- в) Гасно-течна хроматографија за одредување на карактеристичниот профил на маснокиселинската структура .

1.7. Структура на клеточните мембрани (Moriyon, 1997).

Бруцелите се грам негативни бактерии. Нивни клеточни мембрани се: внатрешна (цитоплазматска мембрана) и надворешна (клеточен ѕид).

А. Внатрешната (цитоплазматска) мембрана е двослојна липидна обвивка одговорна за повеќе функции како што се: транспорт на електрони и продукција на енергија (аденозин трифосфат-АТР), одржување на мембранскиот потенцијал со јонски пумпи и прифаќање и ослободување на разни метаболити со транспортни протеини.

* 1. WHO Mediterranean Zoonoses Control Centre Athens-Greece, 2. FAO/WHO Collaborating Centre for Reference and Research on Brucellosis, CVL-New Haw-Addlestone-England

** Ензимскиот систем на родот *Brucella* е дефинитивно одреден. Метаболизмот е оксидативен. Располагаат со цитохром “С” оксидаза и каталаза (Dranovskaya, 1994).

Б. Клеточниот ѕид се состои од:

1. Пептидогликан (Mucoreptide, Murein)

2. Периплазматски простор

3. Надворешна мембрана

1. Пептидогликанот (PG) е многу тенка обвивка (2-4 nm) која во вид на ригидна мрежа ја обвивува цитоплазматската мембрана. Изграден е од линеарни полисахаридни вериги во вид на јаже, попречно поврзани со пептиди. Полисахаридите се состојат од повторувачки дисахариди на *N*-ацетил-глюкозамин (*GlcNAc*, *NAG*, *G*) и *N*-ацетил-мураминска киселина (*MurNAc*, *NAM*, *M*). Тетрапептиди се врзани за *MurNAc* (Murray et al., 1997). Компаративни студии со електронска микроскопија покажале дека кај *Brucella*, интеракцијата на PG со надворешната мембрана е многу поцврста отколку кај *Escherichia coli* (Dubray, 1976), со што би можела да се објасни резистенцијата на *Brucella* кон физичка дезинтеграција.

2. Периплазматски простор е просторот помеѓу надворешната површина на цитоплазматската мембрана и внатрешната страна на надворешната мембрана. Во него има различни хидролитични ензими (протеази, фосфатази, липази, нуклеази, ензими за разградување на јагленихидрати) кои се важни во разградувањето на макромолекулите важни во метаболизмот. Овој простор содржи и компоненти на транспортниот систем за шеќери и други врзувачки протеини кои го олеснуваат внесот на различни метаболити и други соединенија (Murray et al., 1997). Кај *B. abortus* во овој простор докажано е постоење на два важни детоксирачки ензими: Cu/Zn супероксид дисмутаза и каталаза.

3. Надворешната мембрана (Outer membrane-OM) е како густа платнена вреќа околу бактеријата која ја одржува бактериската структура, пермеабилноста за големи молекули, и обезбедува заштита од надворешни влијанија. OM има двослојна липидна структура (Moriyon, 1997; Murray et al., 1997; Karakashevik, 1989):

3.1. Надворешен слој кој по хемиски состав е **липополисахарид (LPS)**, е ендотоксин, а се состои од три структурелни компоненти:

3.1.1. Липид-А, есенцијална компонента на LPS е есенцијален и за опстанок на бактериите. Одговорен е за ендотоксичната активност на LPS. Според неколку студии (Quireshi et al., 1994; Velasco, 1997) липидот-А е изграден од (костур) дисахариди на 2,3-диамино-2,3-дидеокси-D-глюкоза (GLcN3N) во α -1,6 врска, каде α -хидрокси масни киселини (C12, C14 и C16) се амидно врзани. Естерски врзани масни киселини се најдени само во ацил-оксиацил групите и имаат ацилни вериги еднакви или подолги од C16. Дисахаридите се често заменети со фосфати. Иако структурата на шеќерната компонента изгледа константна, постои хетерогеност кај липидот-А, што е веројатно поврзано со степенот на фосфорилација и ацилната субституција (Freer et al., 1995; Velasco, 1997).

3.1.2. Јадрени полисахариди. Структурата на јадрените полисахариди не е потполно објаснета. Компоненти на јадрото се mannose и 2-амино-2,6-дидеокси-D-глюкоза (quinovosamine), 3-деокси-D-мано-2-октулосонат (Kdo) а постојат и докази за постоење на 2-амино-2-деокси-D-глюкоза (GlcN). Веројатно Kdo е врзан за нередуциран шеќер на дисахарид на липидот-А а quinovosamine би можел да го премостува јадрото со О-веригата.

3.1.3. О-антиген (О-верига) О-антигенот е соматски антиген на *Brucella*, постои само кај S-формите (smooth) на бактериите, додека кај R-формите (rough) го нема. Тој е долг линеарен полисахарид кој се состои од 50-100 повторувачки моносахаридни единици составени од 4 до 7 шеќери по единица. Кај *B. melitensis* биотип 1, О-антигенот се состои од повторувачки блокови од пет *N*-формил-йерозамински остатоци (четири α -1,2-врзани и една α -1,3-врзана). Просечниот број на моносахариди е проценет на 96 за *B. abortus* (25 до 92 за *B. abortus* 2308), 35 до 130 за *B. melitensis* 16M (Moriyon, 1997). О-антигенот е поврзан со јадрото. Релативната фреквенција на α -1,2 и α -1,3 врските ја објаснува епитопската структура на О-веригата. Повеќе автори ја прифаќаат модификацијата на Douglas и Palmer (1988) за А+М антигенската структура, според која *B. abortus* е носител на А (*abortus*) епитоп, *B. melitensis* е носител на М (*melitensis*) епитоп, а имаат заеднички С епитоп/и одговорни за вкрстените реакции (Brinley-Morgan et al., 1990; Mayer, 1990; Jawetz et al., 1976; Moriyon, 1997). *B. suis* содржи подеднакви

количини на А и М антигени (Drndarski, 1989). А-антигенот е претставен со линеарни неразгранети хомополимери на α -1,2-врзани-4,6-дидеокси-4-формамидо- α -D-манопиранозилни единици што завршуваат со јадрените олигосахаридни компоненти. М-антигенот го содржи истиот шеќер но изграден како повторувачки пентасахаридни единици составени од четири α -1,2-4,6-ди-деокси-4-формамидо- α -D-манопиранозилни единици врзани во α -1,3 за последниот моносахарид на секвенцата (Perry et al., 1986; Zygmunt et al., 1991).

3. 2. Внатрешен слој-изграден е од фосфолипиди (Moriyon, 1997). Липидниот состав зависи од медиумот и староста на културата. Главен фосфолипид кај *B. abortus* и *B. melitensis* е фосфатидилхолин (PC), 37% од вкупните фосфолипиди. Други фосфолипиди се: фосфатидилетаноламин 33%, кардиолипин 20% и фосфатидилглицерол 10%.

Бруцелите содржат и неутрални масти од кои има значајни количини на орнитин, како и материи слични на восок. Помеѓу двата слоја, надворешниот и внатрешниот, се наоѓаат столпчести формации на протеини.

3.3. Протеините (OMPs) се поделени во три групи според молекуларната маса: 1. Група 1 (88 - 94 kD); 2. Група 2 (36-38 kD), оваа група ја кодираат гените *omp2a* и *omp2b*; 3. Група 3 (31-34 kD и 25-27 kD), оваа група ја кодираат гените *omp25* и *omp31*.

Главни OMPs се *omp25*, *omp31* и *omp26*. Други надворешно мембрански протеини се неколку ниско молекуларни липопротеини идентификувани како минор Omps: *omp19*, *omp16*, *omp10*. На површината на S-формите докажано е присуството на ендотоксичниот S-липополисахарид (S-LPS) и друг полисахарид антигенски сличен на S-LPS, наречен нативен хаптен (NH α), (Tibor et al., 1994; 1996).

Соевите на *B. melitensis*, *B. canis* и *B. ovis* содржат протеини од групата 25-27 kD, многу повеќе од *B. abortus* која содржи повеќе протеини од групата 36-38 kD (Dranovskaya, 1994).

1.8. Антигенска градба. Неколку важни протективни и/или дијагностички антигени се идентификувани на надворешната мембрана, периплазматскиот простор и цитоплазмата (Cloeckhart, 1997):

А. Антигени на надворешната мембрана. Надворешната мембрана содржи липополисахаридни и протеински антигени.

1. Липополисахаридите (LPS) можат да бидат: (Smooth) мазни-липополисахариди (S-LPS) кај S-бруцели, кои содржат О-верига или (Rough) груби-липополисахариди (R-LPS) кај R-бруцели, кои немаат О-верига. О-веригата или О-полисахаридот (О-PS) е главниот имунодоминантен антиген во серолошкиот одговор при инфекција со S-бруцели, и докажано е дека е најекспонираната антигенска структура на површината на S-бруцелите. О-PS е исто така протективен антиген (докажан со експерименти на модели на глувци со помош на пасивна имунизација со анти О-PS моноклонски антитела (Mabs) или со активна имунизација со пурифициран S-LPS или О-PS коњугиран со протеински носачи. О-PS содржи неколку епитопи идентификувани со Mabs како: А, М и заеднички С-епитоп кој е одговорен за вкрстните cross-реакции. Cross-реакции се можни со *Escherichia coli* O:116 и O:157, *Francisella tularensis*, *Salmonella group N* (O:30) *Pseudomonas maltophilia*, *Vibrio cholerae* и *Yersinia enterocolitica* O:9 а титрите можат да бидат значајни (Sokolovski et al., 1994; WHO, 1986).

2. Надворешно мембрански протеини (OMPs). Со употреба на техники на Mabs (моноклонски антитела), ELISA, имуноелектронска микроскопија и Flow-цитометрија, докажано е дека OMPs (стр.24-25; 3.3) се експонирани на површината на бруцелите. Но, тие се многу помалку достапни кај S отколку кај R-бруцели-те, веројатно заради присуството на странична О-верига кај долгиот S-LPS. Овој факт исто така може да објасни зошто кај модел на глувци, Mabs кон OPMs се слабо или воопшто непротективни при вакцинација со *S-B. abortus*. За разлика од ова, Mabs за OMPs за *R-B. ovis*, исто така на модел со глувци, се покажал како високо протективен.

Б. Периплазматски протеини. Идентификувани се неколку имуногени периплазматски протеини: *BCSP31*, Cu-Zn суперексид дисмутаза и неодамна *bp26* (исто така наречен *omp28*). Всушност, *bp26(omp28)* изгледа е интересен дијагностички антиген бидејќи е најден како имунодоминантен кај инфицирани говеда, овци, кози и луѓе. Овој антиген уште не е испитан во

однос на неговата заштитна активност. Имунизацијата на глвци со рекомбинантен *BCSP31* или *Cu-Zn* суперексид дисмутаза не обезбедувала заштита против *B. abortus* (Cloeckaert, 1997).

В. Цитоплазматски протеини. Во оваа група спаѓаат: stress-протеините *groEL*, *groES*, *dnaK*, *htrA*, *L7/L12* рибозомски протеин, *Ss* и *uvrA* протеини, bacterioferritin, како и протеини со непозната функција наречени *p15*, *p17* и *p39*. За некои од овие протеини како *L7/L12*, *uvrA*, *groEL* и *groES*, докажано е дека стимулираат целуларен имун одговор од Th1-тип со продукција на IL-2 и IFN- γ , но до сега сигурен протективен имунитет е докажан само за *L7/L12*. Другите протеини, како *p15*, *p17* и *p39*, се од мал интерес само за серолошка дијагностика.

1.9. Генетика. Геномот на *Brucella* не е целосно секвенциониран. Тој се состои од два циркуларни хромозоми: подолг од 2.100 kbp и покус од 1.150 kbp, и приближно 58% GC (Halling, 1997). Се чини дека покусиот хромозом е помалку конзервиран од подолгиот, и содржи мали инсерции (*IS*) и делеции. *IS* се најдени кај двата хромозоми. Класичните соеви, освен *B. canis*, имаат просечно 8 до 35 копии на инсерциска секвенца *IS711* (*IS6501*). Две слични повторувачки секвенци *Bru-RS1* и *Bru-RS2* од приближно 100 bp се најдени во околу 35 копии, но досега не се поврзани со ниедна функција.

Идентификувани се околу 50 *brucella* гени (табела 1). Многу од нив кодираат надворешно-мембрански протеини, и се изучуваат како вирулентни фактори и како специфични дијагностички реагенси. Исто така се идентификувани гени инволвирани во во целураните процеси, биосинтезата на пурини и пиримидини и искористувањето на глукозата. Нивните генски продукти се високо имуногени.

Од посебен интерес во понатамошното испитување се *IS711* и *BCSP31*. *IS711* се состои од 845 bp (базни парови), и тоа: 198 а (аденин), 237 с (цитозин), 222 г (гуанин) и 188 т (тимин) (Hernandez et al., 1998).

BCSP31 е ген кој кодира 31-Kda надворешен мембрански протеин. Се состои од 1037 bp, и тоа: 233 а; 273 с; 263 г; 268 т (Vizcaino et al., 1996).

Табела 1. *Brucella* гени во GenBank

Функционални групи	Ген/протеин ознака
Клеточна обвивка	<i>omp 1, omp 2a, omp 2b, omp 10, omp 16A, omp 19, omp 25, omp 28, bpm18, bp26, BA41, CP24, cdsA, lpxD, fabZ, lpxA, merA, BCSP31</i>
Целуларни процеси	<i>htrA, htraA-like, dnaD, dnaJ, dnaK, groEL, groES</i>
Енергетски метаболизам	<i>GLK, GLUp, ERY</i>
DNA RNA градежни блокови	<i>purE, purK, purA</i>
Респираторна функција	<i>KatE, sodC</i>
Репликација	<i>RecA, uvrA, adenine methyl transferase</i>
Транслација	<i>16S dRNA, 23S dRNA</i>
Непознато	<i>p39, ORFP17</i>
Повторувачки DNAs	<i>IS711 (IS6501), Bru-RS1, Bru-RS2</i>

1.10. Отпорност. Во соодветни услови, *Brucella* организмите може да преживеат во надворешната средина долго време (WHO, 1986, Goldman, 1986, Flores-Castro et al., 1979).

А. Осетливост кон физички агенси. Бруцелите лесно се убиваат со загревање кога се во разредена суспензија. Пастеризацијата брзо ги убива. Многу густа суспензија неможе да биде комплетно инактивирана со средно загревање, заради што потребно е повеќекратно загревање до точка на вриење. Осетливи се на нормални стерилизирачки дози на јонизирачка радијација, но потребна е комплетна експозиција. Бруцелите преживуваат сушење, особено во медиуми кои содржат протеини. Прилично се осетливи на директна сончева светлина. Во прашина и земја може да опстанат до 10

недели, во вода 10-70 дена (подолго при пониски температури, а многу години ако се замрзнати). Во измет на говедо преживуваат најмалку 120 дена, во абортиран фетус 75 дена, во ексудат на утерус 200 дена и во течно ѓубре при температура близу 0C° 2,5 години. Во младо сирење може да преживеат 100 дена, во кисело млеко 30 дена (при pH 4 само 1 ден), во кефир 11 дена, во путер 25 до 142 дена, во солено месо 40 до 113 дена, во сланина до три месеци (Corbel, 1990; Sokolovski et al., 1994).

Б. Осетливост кон хемиски агенси. Во водена суспензија, голем број дезинфициенси ги убиваат бруцелите. Раствор на фенол (10 g/l) ги убива во водена суспензија по 15 минутна експозиција на 37C°. Присуството на органски материи може да ја намали ефикасноста на дезинфициенсот. Раствор на фенол и алкохол се користат за дезинфекција на кожата.

В. Осетливост кон бои (тионин и базен фуксин) се користи во диференцијацијата на одделни биотипови на *Brucella*.

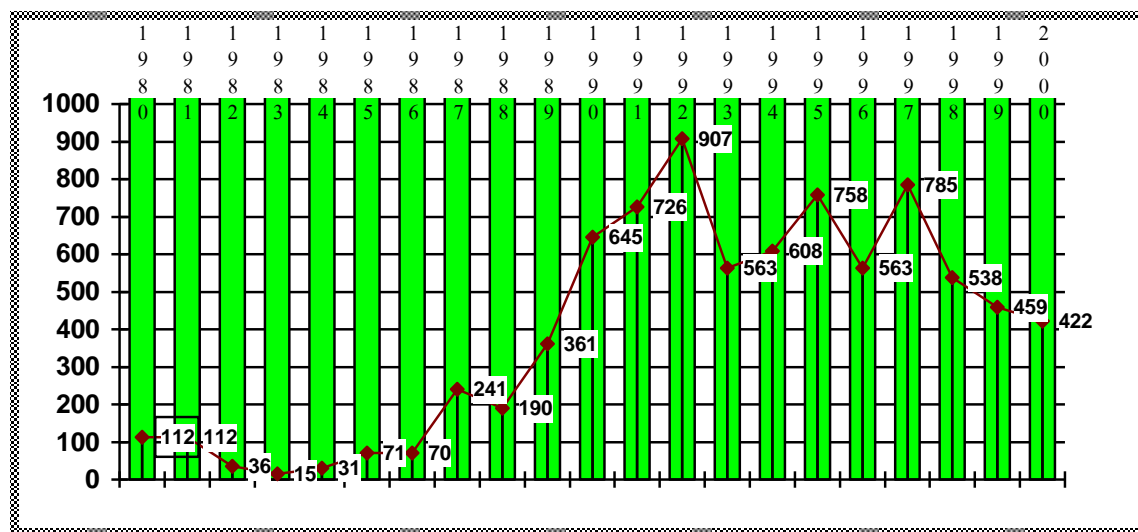
Г. Осетливост кон антибиотици. *In vitro* бруцелите се осетливи кон голем број антибиотици, додека *in vivo* тој број е помал. Најосетливи се кон: стрептомицин, тетрациклини, рифампицин, доксициклин, новите хинолонски препарати, гентамицин, канамицин, сулфаметоксасол/триметоприм.

1.11 Епидемиологија

1.11.1. **Распространетост.** Според податоците на WHO, во светот годишно од бруцелоза заболуваат околу 500.000 луѓе (Williams, 1988). Во Азија, бруцелозата е пријавена од 19 земји, со многу висок морбидитет во Иран, Саудиска Арабија, Кувајт и Лаос (WHO Weekly Epid, 1986; Kiel et al., 1987; Lulu et al., 1988). Во Африка бруцелозата е регистрирана во 37 земји, особено во земјите на Медитеранот. На Американскиот континент, бруцелозата епидемиолошки е значајна во Средна и Јужна Америка (Перу, Аргентина и Мексико). Се јавува и во САД и Канада, но поретко, најчесто се импортирани случаи кај луѓе кои консумирале млечни производи со потекло од Мексико (J Infect Dis, 1977; Center for Diseases Control, 1977; 1978; Weekly Epid, 1984). Во Австралија бруцелозата е под контрола. Во Европа

годишно се регистрираат меѓу 10 и 20 илјади заболени. Од европските земји највисок морбидитет имаат Шпанија, Грција, Италија и Малта (Velimirovik, 1984). Велика Британија е пример на земја каде успешно е извршена ерадикација на бруцелозата. Таму, во седумдесетите години имало по околу 600 случаи годишно, а последниве години само по неколку и тоа импортирани случаи (Great Britain Ministry of Agriculture, 1983; Brit Med J, 1987).

Во Република Македонија до 1980 година бруцелозата не била значајно заболување. Во 1980 година во Битола започнала епидемија но не била на време препознаена. Вкупно заболеле 104 лица, а следната година 112. Во периодот од 1980 до 2000 година во Републикава се регистрирани вкупно 8.225 случаи, од кои во последните шест години (1995-2000) околу 3.500 (графикон 1). Болеста е регистрирана во секоја општина во Републикава. Најголем интензитет на заболени е регистриран во општина Радовиш во 1991 година: 267 заболени, со морбидитет од 875,4 на 100.000 жители (Sokolovski et al., 1995).



Графикон 1. Инциденца на хуманата бруцелоза во Република Македонија (1980-2000)

1.11.2. **Резервоар и извор на зараза.** За луѓето патогени видови бруцели се: *B. melitensis*, *B. abortus*, *B. suis* и *B. canis*. **Резервоар** се домашните животни: овци, кози, говеда, свињи, кучиња, коњи, камили и др., но понекогаш и диви животни можат да бидат привремени резервоари. **Извор** на зараза се инфицирани животни. Болеста се пренесува со млеко, месо,

мочка, плодова вода и урогенитални секрети. Најпатогена за луѓето е *B. melitensis*, заради што во Македонија најголемо епидемиолошко значење имаат овците и козите кои се примарни домаќини за оваа бруцела. Бројот на заболени луѓе е во директна корелација со интензитетот на епизоотијата. Од голема важност е бројот на бацилите кој се лачи преку млекото. Резултатите на Еуге покажале дека во 1 ml неварено козјо млеко имало околу 30.000 бруцели (Todorovik et al., 1972). Кај нас, за разлика од некои западноевропски земји, мал е бројот на заразени говеда заради што и нивната улога во заразувањето на луѓето со *B. abortus* е мала. *B. suis* е значајна во заболувањата кај луѓето во САД. Во последните години има трудови во кои се опишува бруцелоза предизвикана од *B. canis* (Hall et al., 1970; Munford et al., 1975; Polt et al., 1982).

1.11.3. **Патишта на пренос.** Бруцелозата најчесто се пренесува преку контактен и алиментарен пат, а поретко аерогено и со инокулација (Birtasevik et al., 1989). Според наодите на Соколовски и сор. (1995), во Република Македонија до 1993 година, од 4.080 заболени, по контактен пат се заразени 1.142 (32,3%), по алиментарен 712 (20,1%), кај 1.370 (38,7%) постоела можност и за двата, а кај 316 (8,9 %) не можел да се докаже патот на пренос. Контактниот пат на зараза се остварува при пружање помош на gravidни животни, аборттирање, мануелно вадење на плацентата, при стрижење, колење и преработка на сурова кожа. Кај алиментарниот пат најзначајни се млекото и млечните производи ако се употребуваат без претходна термичка обработка (Birtasevik et al., 1989; Lulu et al., 1988; Sixl et al., 1990). По аероген пат најчесто се јавува заразување во лаборатории и во кланици. Stazzniewicz и сор. (1991) опишуваат лабораториска епидемија со *B. melitensis* биотип 3, во 1988 година, кога по аероген пат заболеле 8 лица. Извештаите за лабораториските инфекции во Британија во текот на 1988-1989 година прикажуваат само еден случај со бруцелоза, причинет со *B. melitensis* (Grist et al., 1991). Во текот на 1996 година инфицирани се двајца вработени во лабораторија на Ветеринарниот институт во Скопје.

Интерхуманиот пренос на болеста е исклучително редок. Опишани се случаи на пренесување на болеста, од болна мајка на доенче преку мајчино

млеко (Lubani et al., 1988; Mofada et al., 1993), како и случај на можен пренос преку сперма од заболени маж (Stanik-Pavlinik et al., 1983; Ruben et al., 1991; Kosanovik-Ketkovik, 1981; Nikolovski, 1992).

Заразувањето со инокулација најчесто е акцидентално (лаборатории, просектура). Можно е и инфекција преку трансфузија на крв (Elberg, 1981; Wood, 1955). Пренос од луѓе на животни нема.

1.11.4. Сезона на заболувањето. Бруцелозата во Македонија има сезонски карактер. Бројот на заболени достигнува максимум во мај и јуни, а минимум во ноември и декември. Ова е поврзано со активностите на овчарите при јагнење, јарење, молзење и стрижење при што се вклучени цели семејства. Тогаш е најголемо и излачувањето на бруцелите од инфицираните животни (Sokolovski et al., 1995; Birtasevik et al., 1989).

1.11.5. Значење на професијата, пол, возраст и место на живеење. Во Македонија најголемиот број заболени (81%) биле од селско население. Најмногу заболувале луѓе од преку 50 годишна возраст, при што мажите заболувале два пати повеќе од жените. Најголем ризик за заболување бил кај оние професии кои имале директен контакт со инфицирани животни: овчари, сточари, ветеринарни работници и домаќинки на село (Sokolovski et al., 1995). Опишани се и фамилијарни епидемии со заболување на поголем број членови (Wallach et al., 1994).

1.12. Патогенеза. Бруцелите се инвазивни микроорганизми. Во организмот можат да продрат преку повреди на кожата (најчесто на рацете), преку слезниците, орофарингсот, коњуктивите или со вдишување преку респираторниот систем. Голем број од бруцелите се фагоцитира и уништува, но при голем инокулум, по лимфен пат, извесен број доаѓаат до регионалните лимфни јазли (аксиларни, субмандибуларни и супраклавикуларни) (Соколовски et al., 1994; Kosanovik-Ketkovik et al., 1981). Во регионалните лимфни јазли, бруцелите интензивно се размножуваат во тек на целиот период на инкубација, а потоа преку крвта (со полиморфонуклеарите и моноцитите) се разнесуваат до синусоидите на црниот дроб, слезката, коскениот мозок и лимфните јазли. Бруцелите се размножуваат локално, а потоа нив ги фагоцитираат макрофагите во ткивата каде што се

размножуваат. Бруцелите се релативно отпорни на макрофагното убивање, заради што извесен број може да преживее. Не е јасно дали тие преживуваат заради вродена отпорност или “неспособност“ на макрофагите да ги убиваат. Во макрофагите бруцелите можат да ја инхибираат фузијата на фагозомите и лизозомите и да се реплицираат во фагозомите (Harmon et al., 1988). Клиничките манифестации на болеста по оваа фаза зависат од способноста на организмот да го спречи размножувањето на бруцелите. Патогеноста на бруцелите е делумно зависна од составот на липополисахаридите (LPS) на мазните (S) вирулентни соеви. Можеби LPS придонесуваат за успорена дегранулација на специфичните гранули во полиморфнонуклеарите во кои се наоѓаат бруцелите (Stites et al., 1987). Интраклеточната локализација ги штити бруцелите од дејството на антителата и од дејството на голем број антибиотици. Карактеристична реакција на инфекцијата е создавање на грануломи во некои ткива. По адекватна антибиотска терапија грануломите може да се повлечат и изгубат. При големи инокулуми, и кај неадекватно лекувани пациенти, грануломите може да станат прилично големи, да загнојат и да се создаваат апсцеси. Апсцесите почесто се јавуваат при инфекција со *B. melitensis* и *B. suis*, а грануломи при инфекција со *B. abortus* (Davion et al., 1987; Med hyg, 1990; Abd-Elzrak, 1991; Yildimark et al., 1995; Young, 1983b). Во понатамошната еволуција бруцелите може да ја напуштат крвта и да се населат на синовијалните мембрани на зглобните чаури, тендовагиналните припои на мускулите и во сврзното ткиво. Во нив исто така може да предизвикаат токсоеалергиски и грануломатозни промени кои подоцна во фаза на регресија на болеста се претвораат во сврзно ткиво или калцифицираат. Од грануломите бруцелите повторно можат да навлезат во крвта и да предизвикаат рецидиви (Velkovski, 2000).

1.13. Имун одговор. Инфекцијата со *Brucella* резултира со индукција на хуморален и целуларен имун одговор. Интензитетот на овие одговори зависи од многу фактори како што се: вируленцијата на инфективните соеви, големината на инокулумот, старост, пол, бременост и имунолошкиот статус на домаќинот. Двата вида на имуниот одговор имаат дијагностичка

вредност, но многу повеќе во употреба се серолошки тестови за одредување на хуморалниот имун одговор (WHO, 1986).

А. Целуларниот имун одговор е посредуван од клетки, претежно лимфоцити-Т (Ly-T) и макрофаги. Обично се јавува при навлегување на некои внатрешноклеточни бактерии, вируси, клетки на трансплантанти и тумори. Основниот механизам на дејство е директно цитотоксично дејство на Ly-T и нивните хуморални продукти-лимфокини (Allegreti et al., 1987).

Бруцелите се интраклеточни микроорганизми. Вирулентните соеви, по фагоцитирањето од страна на макрофагите и полиморфонуклеарите, способни се да преживеат и опстанат во нив во тек на долг временски период. Оваа резистенција на бруцелите може да придонесе за хроничитет на инфекцијата (WHO, 1986). Активацијата на макрофагите се јавува кога Т-лимфоцитите (Ly-T) од соодветната субпопулација се стимулирани да ослободат лимфокини (интерлеукини-цитокини). Цитокините се протеини (обично гликопротеини) со релативно мала молекулска маса од 8-25 kDa, често составени само од една верига. Тие регулираат важни биолошки процеси како што се: клеточен раст, клеточна активација, инфламација, имунитет, обнова на ткивата, фиброза и морфогенеза. Некои се хемотактички фактори. Најдобро проучени лимфокини се: интерферони-IFN (α , β и γ) и интерлеукини (IL-1 до IL-12).

Ly-T се претставени како TCR 1+ и TCR 2+ (Roitt et al., 1993):

1. **TCR 1+ (CD4-/CD8- и CD8+)** се мала субпопулација на циркулирачки, цитотоксични Ly-T, застапени до 15% од Ly-T,
2. **TCR 2+ (CD4+)**, помошнички Ly-T (Th1-T-helper), ги има од 85-95 %.

Целуларниот имун одговор има фундаментално значење во одбраната на организмот при инфекција со *Brucella* (Pavlov et al., 1982). CD4+ примарно продуцираат IFN- γ , кој ги стимулира макрофагите за бактерицидна активност, додека CD8+ делуваат со лизирање на клетките во кои има бактерии, со што тие се ослободуваат и можат да бидат фагоцитирани и убиени од активираните макрофаги (Schurig 1991; Golding et al., 1995; Zaitzeva et al., 1995; Cheers, 1997). Zhan и sor. (1995) на анимален модел покажале дека клетките на слеска инфицирани со *Brucella* продуцираат IFN- γ и IL-2, додека

при имунизација продуцираат значајна количина на IL-2 и IL-4 а недектибилни количини на IFN- γ . Santiago и сор. (1991) утврдиле дека кај пациентите со хронична бруцелоза има сигнификантен пораст на CD8+. Cheers и сор. (1997) утврдиле дека *in vivo* IL-12 се продуцира само во присуство на живи бактерии (*brucella* или *listeria*). IL-12 има снажен ефект врз индукцијата на IFN- γ (Zhan et al., 1995), додека IL-10 ја намалува макрофагната активност и продукцијата на IFN- γ (Fernandes et al., 1995).

Б. Хуморалниот имун одговор е посредуван со антитела. По навлегувањето на бруцелите во организмот, како одговор на организмот на бруцелозните антигени се активираат В-клетките кои почнуваат да продуцираат антитела од класите: IgM, IgG (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4) и IgA. Неколку дена по инфекцијата се појавуваат IgM антитела, титарот брзо расте и достигнува највисоко ниво во третиот месец од болеста, а потоа опаѓа. IgG се појавуваат две до три недели по инфекцијата. Титарот на IgG е највисок во шестиот месец од почетокот на заболувањето и останува повишен уште шест месеци кај адекватно лекувани, а најмалку една година кај нелекувани болни. Одржувањето на повишен титар на IgG антителата кај хроничните случаи е условено од присуство на витални интраклеточните бруцели во RES или во други фокуси (WHO, 1986; Mikolich et al., 1990; Klerk et al., 1985; Pellicer et al., 1988). Појавата на IgG во значајни количини има негативен повратен механизам на имунолошкиот одговор, при што се очекува опаѓање на IgM на пониско ниво (White, 1978).

IgA се појавува истовремено со IgG. IgA антителата можат да бидат неаглутинабилни и можат да се докажат со: Coombs-ов антиглобулински тест или ELISA. Кај пациентите со релапс на болеста зголемувањето на титарот на IgG антитела е следено со зголемување на титарот на IgA антителата во околу 60% од случаите (Araj, 1988b).

Испитувајќи ја кинетиката на специфичните IgE антитела, Araj и сор. (1990) утврдиле дека IgE го има во приближно иста застапеност како кај акутната (89%) така и кај хроничната бруцелоза (81%).

1.14. Клиничка слика и тек на болеста. Бруцелозата е тешко инфективно заболување кое трае со недели и месеци. Клиничката слика е

полиморфна, што причинува големи тешкотии во поставувањето на дијагнозата и чести дијагностички грешки. Периодот на инкубација обично е една до четири недели, но може да биде и до 60 дена (Elberg, 1981).

Текот на болеста може да биде акутен или хроничен (Todorovik et al., 1972).

Голям број на автори според времетраењето болеста ја делат на:

- акутна (до три месеци);
- субакутна (до шест месеци);
- хронична (повеќе од 6-8 месеци).

Заболувањето најчесто почнува како акутно (Bennet, 1986; Lulu et al., 1988), а во мал број почнува како примарно хронично.

А. Акутен тек на болеста. Се карактеризира со неочекуван почеток, повишена температура, потење, болки во зглобови и мускули.

- **Температурата** може да трае со месеци. Типот на температурата најчесто е ундулантен, поретко ремитентен или интермитентен. Скок на температурата и треска се јавуваат при повторен продор на бруцелите од жариштата во крвотокот. Субфебрилните периоди се пократкотрајни од фебрилните, а антипиретиците не делуваат. Свеста на болниот е сочувана.

- **Потењето** е многу карактеристично. Болниот "се капе" во пот особено ноќе. Потењето не престанува ниту во афебрилниот период, а потта има мирис на скапана слама. Диурезата е намалена.

- **Болките** се во вид на артралгии и миалгии. Непостојани се по интензитет и траење, се преместуваат од место на место, од ден на ден. Најчесто се јавуваат во половината и вратот. Зафатени се сите а особено големите зглобови. Подвижноста е ограничена.

Објективни знаци на болеста се изразени дури во третата недела од почетокот на заболувањето. Општата состојба на болниот, освен умерена психофизичка исцрпеност, не е многу изменета. Постои умерено губење на тежината, појава на бледило и оток на лицето. Заради зафатеноста на RES присутни се: спленомегалија, хепатомегалија, аденопатија (една или повеќе жлезди се лесно отечени, тврди, поединечни и безболни).

Од хематолошките наоди присутни се: умерена хипохромна анемија и леукопенија (лимфоцитоза со неутропенија).

Акутниот облик на нелекувана бруцелоза трае три до шест месеци.

Б. Хроничниот тек на болеста во најголем број случаи се надоврзува на акутната бруцелоза, а кај еден број започнува како примарно хронично заболување. Хроничната бруцелоза трае една до три години. Оваа форма на болеста се јавува заради нелекување, неадекватно лекување, задоцнет почеток на лекувањето, како и кај мал број правилно лекувани (Nikolovski, 1991). Рецидив на болеста може да се јави во текот на првите три години од излекувањето, а најчесто е во првата година (Kotljarov et al., 1985; Mukovozova et al., 1987; Renoux, 1980). Појавата на рецидиви и хроничитет е условена од интрацелуларното паразитирање на бруцелите, со што се заштитени од разни штетни влијанија и од антибиотици (Kaufmann, 1987).

В. Компликации. Класични компликации на акутната бруцелоза се орхит, епидидимит, салпингит, пневмонија. Кај хроничната бруцелоза често се јавуваат коскено-зглобни промени со контрактури и анкилози. Може да се јави менингит, миокардит, неурит и др.

Г. Прогноза. При навремено откривање и целосно спроведување на терапијата бруцелозата претставува лесно заболување со добра прогноза и ретки компликации. Смртноста кај нетретирани пациенти е 2-3% при инфекција со *B. abortus* и 3-6 % при инфекција со *B. melitens* и *B. suis* (Eldridge, 1998).

1.15. Дијагнозата на хуманата бруцелоза се заснова на епидемиолошки податоци, клинички манифестации и лабораториски тестови (Pellicer et al., 1988; Pokrovski et al., 1989). Дијагностичките тестови опфаќаат бактериолошки, серолошки и алерголошки тестови.

Според CDC (Center for Diseases Control and Prevention, Atlanta) (1977; 1978) бруцелозното заболување се смета за :

1. **Потврден случај** ако од заболел со клиничка слика на бруцелоза се изолира *Brucella*, а реакцијата на спора аглутинација (**Wright**) е $\geq 1 : 160$.

2. **Веројатен случај** ако од заболел со клиничка слика на бруцелоза нема изолација а **Wright** е $\geq 1 : 160$.

Диференцијална дијагноза. Заради полиморфната клиничка слика и продолжениот тек на болеста, бруцелозата може да личи на: туберкулоза, тифус, бактериски ендокардит, кала-азар, маларија, леукоза, инфективна

мононуклеоза, колагеноза, акутен и хроничен ревматизам, артрити, остеомиелити и др. (Kosanovik-Ketkovik, 1982).

1.15.1. Бактериолошка дијагноза. Патолошки материјали од кои бруцелите најлесно може да се изолираат се: крв и стерилан пунктат. Други ткива за изолација се: лимфни жлезди, ликвор, урина, апсцеси. Ретко се изолираат од спутум, плацента, мајчино млеко, вагинален секрет, семинална течност и др. (Pellicer et al., 1988). Во испитувањето на Shehabi и сор. (1990), хемокултурите биле позитивни во 44,4%, сигнификантно посензитивни од културите на коскена срцевина со 27,7%.

Според WHO (Laboratory biosafety manual) родот *Brucella* е класифициран во Ризична група III, што значи дека претставува висок ризик за вработените (Microbiology manual. Merck, 1994). Работата со култури на бруцели или со силно инфицирани примероци како што е абортиран материјал, претставува сериозен ризик за инфекција на лабораториските работници. Работите со *Brucella* мора да се вршат во "Сигурносни комори" (Biosafety cabinets) од III или IV степен, кои обезбедуваат комплетно задржување на инфективниот материјал и аеросолите. Вработените треба да се добро извежбани и мора да носат заштитна облека (Corbel, 1979; WHO, 1983; Centers for Disease Control, 1988). Во просторијата треба да има вентилација со притисок нешто понизок од околината. Сидовите да се непропустливи а прозорците затворени. Пристап на глумци и инсекти мора да биде оневозможен.

Испитувањето на серуми, при вообичаени сигурносни мерки, е со минимален ризик.

Култивирањето на *Brucella* е можно само на збогатени посевки од кои се препорачуваат неколку вида (Biolife manual, 1991):

1. *Brucella* агар. Модификувана посевка според Wundt, се употребува за изолација и култивација од клинички материјали и прехранбени производи.

2. *Brucella*-селективен агар се користи, при изолација од контаминирани материјали при што порастот на придружната микрофлора се супри-

мира со додавање на антибиотици (Bacitracin 25.000 IU/l, Polymyxin B sulphate 6.000 IU/l, Cyclohexamide 100 mg/l, Ethyl violet 1,25mg).

За примарна култура инкубацијата се врши во 10% CO₂, четири до пет дена на 37C°, додека порастот стане видлив. Ако нема видлив пораст, се обновува CO₂ атмосферата и се инкубира до 21 ден. Колониите се во пречник од 2-7 mm, кружни, со боја на блед ќилибар, слабо опалесцентни и транслусцентни (Biolife manual., 1991; Microbiology manual Merck, 1994).

3. Tryptose agar (Biotone agar-Biolife). На оваа посевка колониите се розеви, транслусцентни, со мазни рабови и мазна поовршина, полукружни, со пречник од 1-5 mm.

4. Tryptose bujon (Biotone broth-Biolife) се препорачува за изолација, култивирање и диференцијација на *Brucella*.

Диференцијални посевки за одредување на видот на бруцелата можат да се подготват со додавање на 0,1% раствори на боите тионин и фуксин. Боите се додаваат на Биотон агар или Серум глукосат медиум во пропорции: тионин 1: 25.000, 1: 50.000 и 1: 100.000, базен фуксин 1: 50.000 и 1: 100.000.

За хемокултури може да се користат :

1. Tryptose citrate bujon

2. Vital AER (bioMerieux)

3. BBL™SEPTI-CHEK™ (BECTON DICKINSON)

Во последните години развиени се и се користат модерни системи за хемокултури, како што се: API 20 NE (Batchelor et al., 1992), Bact/Alert™, Bactec NR 660 (Yagupski, 1994), Bactec NR 730 (Gamazo et al., 1993), Bactec 9240 (Hussain et al., 1995), VITAL-BioMerieux, но и со нив е потребна најмалку 10-дневна инкубација. Исто така, во последните години развиени се техники со многу голема сензитивност и специфичност (со можност за откривање на 10 pg DNA) врз база на амплификација на DNA, како што е PCR (Polimerase Chain Reaction) (Baily et al., 1992; Romero et al., 1994; 1995).

1.15.2. Серолошка дијагноза. Серолошките тестови го одредуваат специфичниот хуморален одговор кај пациентите. Постојат неколку групи

на серолошки тестови кои се користат во дијагноза на хуманата бруцелоза во Републикава.

А. Аглутиниращки тестови:

1. Тест на брза аглутинација на плочка (Rose Bengal test-RBT, BAV-тест, Brucelloslide test) е високо сензитивен. Може да биде лажно негативен при постоење на неаглутиниращки антитела, а лажно позитивен при некои хронични дегенеративни заболувања. Се користи само како скрининг тест. Се изведува за четири минути. Позитивните серуми се испитуваат и со другите серолошки методи. Со овој тест не може да се утврди дали аглутинацијата се должи на IgM или IgG антителата.

2. Реакција на бавна аглутинација во епрувети (Wright-Serum agglutination test-SAT). Најголем процент на позитивни наоди на овој тест има во акутната, помал во субакутната а најмал при хроничната фаза на болеста. Со овој тест не може да се утврди дали аглутинацијата се должи на присуството на IgM или IgG антителата.

3. 2-Mercaptoethanol (2-ME) тест. 2-ME ги редуцираат дисулфидните врски на IgM со што се губи нивната способност за аглутинација, додека IgG остануваат активни (WHO, 1986; Robertson et al., 1980). Со ова може да се утврди дали аглутинацијата се должи на IgM, IgG или двата имуноглобулини, што е неопходно во одредувањето на фазата на болеста. Тестот е првпат воведен во употреба во Република Македонија во 1996 година (Taleski, 1996).

4. Антихуман глобулински тест (Coombs antihuman globulin test). Се користи за докажување на неаглутиниращки антитела. Тестот е позитивен ако постои аглутинација за две или повеќе разредувања од Wright-тестот.

Б. Реакција на врзување на комплемент (РВК, Complement fixation test-CFT). IgG има својство да го врзе комплементот додека IgM често не го врзува, така што во раните фази на бруцелозата, кога е присутен само IgM, реакцијата на врзување на комплементот (РВК) е негативна. Кај акутната форма на бруцелозата титрите на РВК почнуваат да растат од вториот месец од заболувањето а максимумот го достигнуваат во четвртиот месец.

Кај субакутна и хронична форма РВК е обично позитивна. Високи титри може да се одржат и по 12 месеци од почетокот на болеста.

Недостаток на сите овие тестови е што со нив не може прецизно да се утврди на кои антитела се должи аглутинацијата. За поточна дијагноза неопходно е изведување на сите тестови за што се потребни два до три дена. Употребата на 2-МЕ ја унапреди дијагностиката, но 2-МЕ е многу токсичен заради што не наиде на примена и во други лаборатории.

1.16. Терапија. Се употребува каузална и симптоматска терапија. Правилното лекување на бруцелозата има голема важност за текот на болеста, превенција на рецидиви, компликации и преминување на болеста во субакутна и хронична форма. Се смета дека ако со терапија се започне во рок од еден месец од почетокот на болеста, истата може комплетно да се излекува (Sokolovski et al., 1994).

Пред изборот на комбинацијата на антибиотиците треба да се знае следното (Stavreas, 1993):

- Бруцелите се интрацелуларни микроорганизми, што бара задоволително пенетрирање на антибиотиците во клетките и ткивата;
- Докажано е дека комбинирана антибиотска терапија е поефикасна од монотерапија;
- Минимален временски третман е шест недели;
- Речиси сите начини на третман ја контролираат акутната фаза на болеста. При компликациите е потребна продолжена комбинирана терапија.

Првобитно предложената комбинирана терапија од страна на WHO по шема: **Tetracycline** перорално на секои 6h во доза од 500 mg во тек на шест недели, заедно со **Streptomycin** интрамускулно во доза од 1,0 g на ден во првите три недели, не дала задоволителни резултати и не е повеќе третман на избор. Подобри резултати се добиваат со терапија со **Rifampicin** во доза од 600-900 mg на ден комбиниран со **Doxycycline** по 200 mg на ден. Двата лека се даваат наутро во еднократна доза. Релапсите се невообичаени по ваков

третман, кој трае најмалку шест недели (WHO, 1986; Benet, 1986; Rakel, 1986; Williams, 1988).

Co-trimoxasole (trimethoprim 160 mg + sulfametoxasol 800 mg) е исто така ефикасен, но ако се дава како монотерапија релапсите се чести дури и при подолготраен третман (WHO, 1986; Stavreas, 1993). Дозирањето е 3X2 таблети дневно во тек на три недели, а потоа 2X2 таблети до шест недели. Cotrimoxasol-от може да се комбинира со rifampicin или streptomycin, chloramphenicol или ciprofloxacin, давани за време од најмалку три недели.

Резултатите на две мултицентрични студии, објавени од Acocella и сор. (1989) и Grassi (1993), покажале дека продолжен третман (45 дена) со: **doxycycline** 200 mg на ден заедно со единечна доза од 900 mg **rifampicin**, или **doxycycline** со **streptomycine** (1 g im , во првите 21 ден) причинува излекување во 95-96% случаи, што е многу поефикасно од препораките на WHO за терапија со tetracycline и streptomycine (излекување во 59% случаи). Според студијата на Colmenero и сор. (1994), комбинацијата на **rifampicin** со **doxycycline** се покажала послаба од комбинацијата **doxycycline** со **streptomycine**. Во некои институции се употребуваат по три антибиотици истовремено: aminoglikozidi (streptomycin) во траење од 28 дена и tetraciklini i sulfonamidi во траење од 42 дена (Velkovski, 2000). За третман на деца со бруцелоза, Wendell (1990) препорачува: за деца под осум годишна возраст **rifampicin** 15 mg/kg, орално, во тек на 45 дена, а за деца над осум години **doxycycline** 100 mg, орално, 30 дена во комбинација со **rifampicin** 900 mg орално 30 дена, а за бремени жени **doxycycline** 100 mg, орално, 45 дена. Во терапијата на бремени жени, според WHO, лек на избор е **rifampicin** (WHO, 1986). Според Sanford-овиот водич за антимикробна терапија од 1998 година, за терапија на бруцелозата се препорачува: за возрасни и деца постари од осум години **doxycycline** + **gentamicin** или **doxycycline** + **streptomycine**, а за деца помали од осум години **Co-trimoxasole** (trimethoprim 160 mg + sulfametoxasol 800 mg) + **gentamicin** (Gilbert et al., 1998).

Флуорокинолоните (**ciprofloxacin**, **ofloxacin**, **pefloxacin**, **lomefloxacin**), заради нивната орална употреба, високата концентрација во ткивата, евидентната интрацелуларна концентрација (во фагоцитите) значајна во

однос на екстрацелуларната концентрација, *in vitro* активноста кон ***Brucella***, ги прават атрактивни за примена. Во секој случај, студиите *in vitro* покажале дека флуорокинолоните не треба да се користат во почетната (примарна) терапија заради селекцијата на разистентни соеви и неефикасната анти-бактериска активност при достигната интрацелуларна концентрација при рН 5 (што е рН на фаголизозомите) (Stavreas, 1993). Студијата на Printzis и сор. (1994) за третман на анергични пациенти, покажала дека терапијата со **Interferon $\alpha 2b$** резултирала со сигнификантни клинички и имунолошки докази и големи ветувања во терапијата на хроничната бруцелоза. Терапијата со **levamisole** дала послаби резултати, а конвенционалната терапија ја влошила состојбата на болните.

Новите макролиди (пр. **clarithromycin**) и азалиди (пр. **Azithromycin**) се многу поактивни од **eritromicin**-от (Garcia et al., 1993). Нивната клиничка употреба е во фаза на испитување.

1.17. Ерадикација и превенција. Ерадикацијата на бруцелозата кај луѓето зависи од ерадикацијата кај животните. Тоа е долготраен и скап процес за кој се потребни огромни материјални средства. Во САД биле потребни 50 години за ерадикација на бруцелозата, што траело до 1997 година. Во Велика Британија ерадикација на бруцелозата е прогласена во 1985 година.

Со вакцинација на добитокот драстично може да се намали морбидитетот кај населението (Roux, 1979). Во употреба биле различни вакцини. Најуспешни биле атенуираните, живи вакцини, како што се:

1. ***B. abortus* 19** е вакцина направена од атенуиран сој 19, во S-форма. Главен проблем за употреба на оваа вакцина е присуството на О-веригата која индуцира продукција на антитела, заради што со серолошки тестирања не може да се разликува вакцинирано од инфицирано говедо (Schuring, 1997).

2. ***B. melitensis* Rev.1** е жива, атенуирана вакцина (WHO, 1986). И оваа вакцина индуцира продукција на антитела, заради што со серолошки тестирања не може да се разликува вакцинирано од инфицирано говедо.

3. Други живи вакцини користени во минатото: ***B. suis* 2** (М-мукоидна варијанта) и ***B. abortus* 104-M**, биле користени во Кина, но не наишле на

поширока примена. Заштитата трае една година, по што се врши ревакцинација (WHO, 1986; Drankin et al., 1972; Strady et al., 1993).

4. Вакцини направени од мртви бруцели или од антигенски фракции.

Вршени се бројни испитувања при што се користени цели убиени бактерии, клеточни обвивки, OMPs, екстракти од клеточни обвивки, хемиски модифицирани бруцела протеини, синтетски пептиди и др., но овие вакцини не биле прифатени во праксата (Bentejac et al., 1984; Desmettre et al., 1984).

5. Вакцина од R-соевите на *B. abortus* 45/20 даваат добра заштита, но вакцината не е стабилна, т.е. R-формите преминуваат во S-форми, при што кај животните по вакцинацијата поради O-веригата се јавуваат антители, што прави дијагностички проблеми.

6. Вакцината **RB51** е жива, атенуирана вакцина од R-сој на *B. abortus*. R-формата кај оваа вакцина е многу стабилна и заради непостоењето на O-верига нема индукција на антители и не се јавуваат дијагностички проблеми како кај другите вакцини. Заштитата со оваа вакцина трае една година. Во САД е прогласена за официјална вакцина, со што е исфрлена од употреба *B. abortus* 19.

7. Други **R-вакцини** кои се очекува да се користат во иднина се: **VTRM1** (R-мутант од *B. melitensis*) и **VTRS1** (R-мутант на *B. suis*).

8. **Рекомбинирани вакцини** и од неодамна чиста **DNA** се сèуште во фаза на испитување, но се чини дека во овој момент се прилично скапи.

2. МОТИВ ЗА ИЗРАБОТКА НА ДИСЕРТАЦИЈАТА

Поставувањето на клиничката дијагноза на хуманата бруцелоза во Република Македонија се врши врз основа на клиничката слика, епидемиолошка анкета и стандардни серолошките тестови (BAB, Wright, Coombs). Со овие серолошки тестови не може да се одреди видот (IgM и/или IgG) и точниот титар на антителата што е неопходно за одредување на фазата и текот на болеста, и одговорот на антибиотскиот третман. Особено е голем проблемот при постоење на симптоми кај пациентите по завршетокот на лекувањето од бруцелоза, кога клиничарот тешко може да се одлучи дали е потребен или не понатамошен антибиотски третман. Со компаративна проценка на резултатите на ELISA во однос на стандардните серолошки методи, може да се утврди вредноста на ELISA и можноста за надминување на наведените проблеми во серолошката дијагностика на хуманата бруцелоза. Воведувањето на ELISA дијагностиката би го скратило времето на утврдување на дијагнозата на 2-3 часа наместо 2-3 дена кои се потребни за останатите методи, а цената на тестот е доста пониска.

До денес во нашата Република не е воведена бактериолошка дијагностика на хуманата бруцелоза во рутинска работа заради потребата од посебни услови, специјална опрема, ризикот при работа со *Brucella*, долгото време на инкубација, различен успех на изолација (10-90%). Во секојдневната работа, особено по воведувањето на автоматски системи за хемокултури во некои лаборатории, не е исклучена можноста од изолација на бруцели. Заради несоодветните услови за работа (немање безбедносни комори од III/IV степен), постои голема опасност за вработените од интралабораториска инфекција. PCR дава можност за идентификација на бруцелите без опасност по вработените. Времето на идентификација значително би се скратило, од неколку дена потребни за биохемиски реакции на помалку од еден час. Можноста за утврдување присуство на бруцелите во периферната крв на болните би ги надминала сите наброени проблеми во врска со изолацијата и идентификацијата. Воведувањето на PCR и ELISA во дијагностиката на хуманата бруцелоза ќе овозможи установување на референтна лабораторија во Републикава.

3. ЦЕЛИ НА ИСПИТУВАЊЕТО

Основна цел на испитувањето е унапредување и комплетирање на дијагностиката на хуманата бруцелоза преку воведување на ELISA и PCR во рутинската дијагностика, заради што се поставени следните цели:

1. Компаративна проценка на дијагностичката вредност на ELISA во однос на стандардните серолошки методи (BAB, Wright, Coombs) во дијагностиката на хуманата бруцелоза врз основа на статистичките показатели за добиените резултати (специфичност, сензитивност, позитивна и негативна прогностичка вредност и репродукцибилност).
2. Компаративна проценка на вредностите на наодите од ELISA во однос на PCR во дијагностиката на хуманата бруцелоза врз основа на статистичките показатели за добиените резултати (специфичност, сензитивност, позитивна и негативна прогностичка вредност).
3. Одредување на најдобриот пар прајмери за детекција на *brucella* DNK со PCR.
4. Утврдување на специфичноста, сензитивноста, позитивната и негативната прогностичка вредност на PCR во дијагностиката на хуманата бруцелоза преку детекција на *brucella* DNK од периферна крв и од бактериолошки култури на *brucella*.

4. МАТЕРИЈАЛ И МЕТОДИ

4.1. МАТЕРИЈАЛ

Испитувањата се спроведени во текот на 1997-2000 година. Крв се земаше и е добивана главно од пациенти од одделенијата за заразни болести: Штип, Прилеп, Тетово, Струмица и Воена Болница-Скопје, како и во рамки на теренски студии и испитувања во соработка со заводите за здравствена заштита: Прилеп, Штип (Радовиш), Тетово, Струмица и Заводот за превентивна медицинска заштита при Центар на военоздравствени установи (ЦВЗУ)-Скопје. Во рамките на теренските испитувања комплетно се опфатени селата: Селце (Штип), Габревци (Радовиш), Канатларци (Прилеп), Висока Маала (Струмица) и Бродец (Тетово). Одреден број примероци добивме и од Клиниката за инфективни болести при Медицинскиот факултет-Скопје. Крв од здрави доброволни крводарители добивме од Станицата за трансфузија на крв при ЦВЗУ-Скопје.

4.1.1. Серуми

Серолошки испитувања се извршени на вкупно 1.100 серуми и тоа :

- од 100 болни во акутна фаза на болеста 400 примероци серуми, по четири серуми од секој болен, по еден серум при приемот во болница, по завршетокот на лекувањето, по три и шест месеци од лекувањето;
- од 100 лица лекувани од бруцелоза со продолжителни симптоми, 200 серуми, по два примерока на растојание од шест месеци;
- од 100 лица лекувани од бруцелоза без симптоми, 200 серуми, по два серуми од секое лице, земени на растојание од шест месеци;
- по еден серум од 300 здрави доброволни крводарители, војници од Армијата на Република Македонија, вкупно 300 серуми.

4.1.2. Крв за PCR

Истовремено, при земањето крв за серолошки реакции, од истите лица е земена по 4 ml крв во епрувети со антикоагуланс (EDTA) за PCR, и тоа :

- од 100 болни со акутна бруцелоза при приемот во болница, 100 примероци крв, по еден примерок од секој болен;

- од 100 лица лекувани од бруцелоза со продолжителни симптоми, 100 примероци крв, по еден примерок од секое лице;
- од 100 лица лекувани од бруцелоза без симптоми, 100 примероци крв, по еден примерок од секое лице;
- по еден примерок крв од 30 здрави лица, доброволни крводарители, војници од Армијата на Република Македонија.

4.1.3. Прајмери и проби во RAPID PCR

Во текот на испитувањето се користени следните прајмери:

A. IS711

***Brucella abortus*:**

Преден прејмер (Fa144)

5' CAT TGA AGT CTG GCG AGC A 3' (19)

Заден прајмер (R 301)

5' TAT CGT CGT ATT GCG CTG C 3' (19)

***Brucella melitensis*:**

Преден прејмер (Fm 167)

5' AGC GTG ACG AAG CAC TGT CT 3' (20)

Заден прајмер (R 301)

5' TAT CGT CGT ATT GCG CTG C 3' (19)

***Brucella suis*:**

Преден прејмер (Fs 194)

5' AGC GTG ACG AAG CAC TGT CT 3' (20)

Заден прајмер (R 301)

5' TAT CGT CGT ATT GCG CTG C 3' (19)

TagMan Probe (230)

6FAM-CGG TTG CAC AGG CCC CGA CA -TAMRA (20)

Задните примери (R 301) и TagMan Probe се потполно исти, специфичноста зависи од разликата на предните прајмери.

B. BCSP31

Преден прејмер (F 622)

5' GCG TTG GGA GCG AGC TTT 3' (18)

Заден прајмер (R 681)

5' GCC AGT GCC GAT ACG GAA 3' (18)

TagMan Probe (640)

6FAM-CGG TTG CAC AGG CCC CGA CA-TAMRA (20)

4.2. МЕТОДИ

Лабораториските анализи се изведувани во следните институции: ЦВЗУ - Скопје, во Институтот за патологија, оддел за микробиологија, на армијата на САД во Вашингтон ДЦ (AFIP- Armed Forces Institute of Pathology- Washington DC-USA), Македонска академија на науките и уметностите, Центар за генетски инженеринг и биотехнологија (МАНУ).

Серолошките испитувања со класичните серолошки методи, ELISA, како и дел од RAPID-PCR се извршени во микробиолошкото одделение во ЦВЗУ. Главниот дел од RAPID-PCR испитувањата како и изолацијата и идентификацијата на културите на *Brucella* се извршени во AFIP, Гел-електрофореза на дел од амплифицираните *brucella* DNA во МАНУ.

4.2.1. Стандардни серолошки методи:

4.2.1.1. Тест на брза аглутинација на плочка (RBT, BAV-тест)

Тестот се употребува за рана детекција на *brucella*-специфични антитела (*brucella melitensis*, *abortus* и *suis*). Антигенот е направен од концентрирана суспензија на *B. abortus* 99 (сој Weybridge) инактивиран со загревање и фенол (0,5%) во ациден пуфер (лактат, pH 3,65), потоа обоен со црвена боја (Rose Bengal test, RBT-bioMerieux-Lyon) или сина боја (BAV тест, Инеп-Земун).

Тестот се изведува според упатството на производителот. Реагенсите и серумот пред употреба треба да ја достигнат собната температура (18-25⁰C). Во кругот на плочката која се добива со реагенсите, се става по 30 µl од примерокот на серумот што се испитува и 30 µl од антигенот (претходно добро измешан). Се мешаат со пластично стапче, потоа се ставаат на ротатор, на бавна ротација за постојано мешање за време од точно четири минути. Читањето се врши точно по четири минути, затоа што по ова време можни се лажно позитивни, неспецифични реакции. Тестот е позитивен ако се јави аглутинација, која зависно од присутната количина на антитела има

различен интензитет, кој некои автори го означуваат со: + (ситнозрнеста аглутинација), ++ (крупно-зрнеста аглутинација, која се јавува во тек до четири минути) и +++ (крупно-зрнеста аглутинација која се јавува за многу покусо време од четири минути). Дури и слаба, ситнозрнеста аглутинација означува позитивност на тестот. Овој тест е скрининг тест и е погоден за масовни испитувања на луѓе и животни. Позитивните серуми треба да се испитаат со други серолошки методи. Тестот е негативен ако нема аглутинација.

4.2.1.2. Тест на бавна аглутинација во епрувети (Wright)

Тестот се изведува според стандарен метод, во епрувети. Во првата епрувета се става 0,8 ml 0,85% физиолошки раствор (NaCl) и 0,2ml серум, а во следните само по 0,5 ml NaCl. Потоа се префрла по 0,5 ml од разредениот серум, кој добро се ресуспендира, од првата во втората епрувета, од втората во третата и т.н. Од последната епрувета се исфрлаат 0,5 ml. На разредениот серум во секоја епрувета се додава по 0,5 ml 10% *Brucella*-антиген (*Brucella abortus* 99-Weybridge-Ветеринарски завод Загреб), со што се добиваат разредувања на серумот од 1/10, 1/20, 1/40, 1/80, 1/160, 1/320, 1/640 и 1/1280. Резултатите се читаат со аглутиноскоп или лупа по инкубација во термостат, во време од од 24h на 37⁰C. Позитивни се наодите со аглутинација во титар $\geq 1/160$, што се должи на присуството на аглутинирачки IgM и/или IgG антитела. Интензитетот на аглутинацијата се одредува по следното (Sokolovski et al., 1994):

++++ = 100% аглутинација, има целосна аглутинација и седиментација, течноста над талогот е бистра, а со протресување талогот се разбива во помали крпчиња;

+++ = 75% аглутинација, речиси целосна аглутинација и седиментација, течноста над талогот е сосема малку заматена, а талогот со протресување се разбива во помали крпчиња;

++ = 50% аглутинација, сè уште има изразена аглутинација, течноста над талогот е силно заматена, со протресување талогот се разбива на многу ситни честички;

+ = 25% аглутинација, нема видлива аглутинација, течноста над талогот е силно заматена, а со протресување талогот се разбива на многу ситни, едвај видливи честички;

- = нема аглутинација, течноста е потполно заматена, при протресување нема никакви видливи честички.

4.2.1.3. Антихуман глобулински тест (Coombs)

Принцип на тестот е откривање на неаглутиниращки антитела (IgG и/или IgA). Изведување на тестот: по читање на Wright тестот истите епрувети се центрифугираат 20 минути на 3.000 до 4.000 вртежи во минута, по што се отфрла супернатантот а на седиментот се додава 1 ml 0,85% NaCl. Се меша седиментот и повторно се центрифугира 20 минути на 3.000 до 4.000 вртежи во минута. Оваа постапка се повторува уште два пати. На крајот во секоја епрувета се додава по 1 ml 0,85% NaCl и по 0,1 ml Coombs-реагенс (зајачки антихуман глобулин, анти IgM, IgG, IgA-Имунолошки завод-Загреб), разреден 1/20. Се инкубира во термостат во време од 24h на 37⁰C и потоа се чита со аглутиноскоп. Со овој тест се откриваат неаглутиниращки антитела (IgG и/или IgA) кои не можат да се докажат со Wright тестот. Позитивни наоди се оние каде има аглутинација во титар $\geq 1/160$, во разредување четири пати или повеќе (две или повеќе разредувања) од резултатите на Wright тестот .

4.2.2. ELISA

4.2.2.1. Принцип на работа.

ELISA е метод за квалитативно и квантитативно одредување на антителата во серумот. За одредување на IgM и IgG *brucella* антитела со ELISA во серумот на пациентите користени се *BRUCELLA* IgM и IgG микроплочи на NOVUM Diagnostica, обложени со *Brucella* LPS антиген.

При одредувањето на IgM антителата, серумите се разредуваат и истовремено се врши апсорпција со IgM sample diluent кој содржи анти-хумани IgG антитела за елиминација на компетитивната инхибиција од специфичните

IgG антитела, и го отстранува и реуматоидниот фактор, кој може да даде лажно позитивни резултати ако е присутен.

Разредените серуми се ставаат во соодветните бунарчиња на микроплочката. За време на првата инкубација специфичните *brucella* IgM и IgG антитела на позитивните серуми се врзуваат за антигените со кои се обложени бунарчињата на микроплочката. По испирањето и отстранувањето на неврзаните примероци, во бунарчињата се става коњугат (анти-хумани IgM и IgG антитела коњугирани со ензимот horseradish пероксидаза). За време на втората инкубација коњугатот се врзува за антителата кои претходно се врзале за антигенот, што резултира со формирање на ензимски врзани имуни комплекси. Со второто испирање се отстранува неврзаниот коњугат, а формираните имуни комплекси (во случај на позитивен резултат) се детектираат по инкубација со ТМВ хромоген супстрат (3,3',5,5'-tetra-methyl-benzidine) и развивање на сина боја. Сината боја преминува во жолта по додавање на Stopping solution (раствор за стопирање на реакцијата во кој има сулфурна киселина). Интензитетот на бојата е пропорционално зависен од количината на специфичните *brucella* IgM и IgG антитела во серумот.

4.2.2.2. Подготовка на реагенсите и серумите

Растворот за испирање (Washing solution) се разредува во однос 1/20 (пр.10 ml раствор +190 ml вода) со свежа, стерилна, редестилирана вода. Разредениот раствор за испирање е стабилен четири недели ако се чува на 2-8°C.

Секој серум се разредува со IgM/IgG дилуент во однос 1:101 (10 µl серум +1 ml дилуент) и се меша.

4.2.2.3. Изведување на тестот

Многу е важно пред почетокот на работата сите реагенси и серуми да бидат на собна температура (18-25°C).

Првото бунарче (A1) на микроплочката се остава празно (слепа проба), во второто (B1) и третото (C1) се става по 100 µl од негативната контрола, во

четвртото бунарче (D1) 100 µl од позитивната контрола, а во останатите бунарчиња по 100 µl од секој серум на пациентите (претходно разреден). Се покрива микроплочата со фолија и се инкубира во термостат во време од 1h/37°C.

По инкубацијата микроплочата се мие три пати, во автоматски мијач TECAN-Washer, и се отстранува вишокот на течноста со тапкање на попивна хартија.

Се става по 100 µl *Brucella* анти-IgG/IgM коњугат во сите бунарчиња освен во првото (A1) и се покрива со фолија.

Се инкубира 30 min. на собна температура, при што мора да се заштити од директно дејство на сончева светлина.

По инкубацијата се мие микроплочата три пати, и се отстранува вишокот на течноста со тапкање на попивна хартија.

Се става по 100 µl TMB раствор во сите бунарчиња и повторно се покриваат.

Се инкубира точно 15 min. на собна температура и во темно.

Се става по 50 µl од растворот за стопирање на реакцијата во сите бунарчиња по истиот редослед како што е ставан TMB растворот и нежно се промешува.

Со читачот на апарат TECAN-Classic се мери оптичкиот дензитет (ОД), т.е. апсорпцијата на секое бунарче со филтер од 450 nm, и со референтен филтер од 620 nm.

4.2.2.4. Интерпретација на резултатите

Резултатите на ELISA испитувањата се толкувани во однос на добиените наоди на оптичките дензитети (ОД) за Cut off-от. Вредноста на Cut-off (CO) се одредува по формулата $CO = MN + 0.250$, при што MN претставува средна вредност на резултатот од двете негативни контроли.

- Позитивни беа сите наоди со резултат на ОД повисок за 10% од Cut off-от (горна граница),
- Негативни оние за 10% пониски од Cut off-от (долна граница).

- Сите резултати со вредности на ОД помеѓу вредностите на долната и горната граница беа резултати во сивата зона (+/-). За овие серуми тестовите се повторуваа.

Добиената вредност на ОД на серумите се дели со вредноста на Cut off-от и добиените вредности се интерпретираат според следното:

Табела 2. Интерпретација на ELISA наодите

Позитивни (+)	≥ 1.10
Сива зона (+/-)	0.91 до 1.09
Негативни (-)	≤ 0.90

4.2.3. PCR

- PCR-RAPID

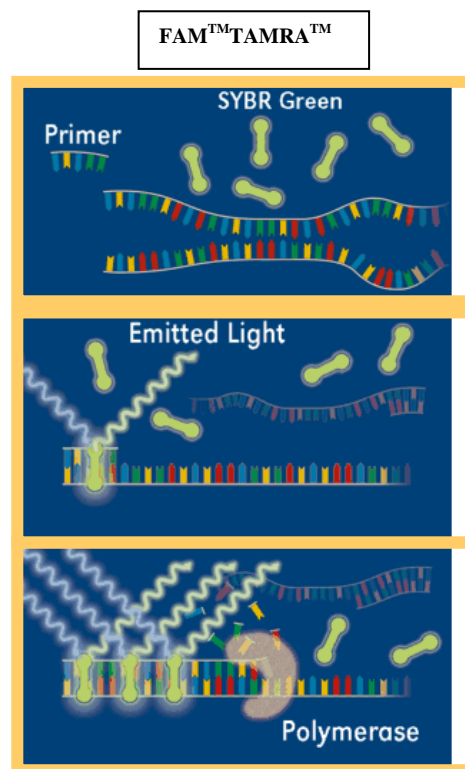
PCR амплификација е вршена со RAPIDTM-PCR (Ruggedized Advanced Pathogen Identification Device) на Idaho-Technology, кој е модифициран Light-CyclerTM (Roche), отпорен, транспортибилен, погоден за работа и во теренски услови. RAPID е автоматски инструмент со капацитет од 32 примероци. Загревањето и ладењето е со воздух и е исклучително брзо ($>25^{\circ}\text{C}/\text{sec}$) заради што RAPID е најбрзиот термоцајклер (може да се направат 40 циклуси за < 20 мин).

Постојаниот флуориметриски мониторинг на двојно-верижната DNA боја SYBR[®] Green или TaqMan[®] проби (6-FAM-oligo-TAMRA,) ја елиминира потребата од последователна анализа (гел електрофореза) по амплификацијата.

Во испитувањето се користени TaqMan проби, кои се специфични сегменти на *Brucella* DNA (20 bp) на чии краеве се врзани две флуоресцентни бои: 6-FAMTM (Perkin Elmer) врзана за 5' и TAMRATM (Perkin Elmer) врзана за 3'. Максимална апсорпција на 6-FAM е 494 nm, а на TAMRA 560 nm. Максимална емисија на FAM-6 е 522 nm а на TAMRA 582 nm. Флуоресцентните бои се

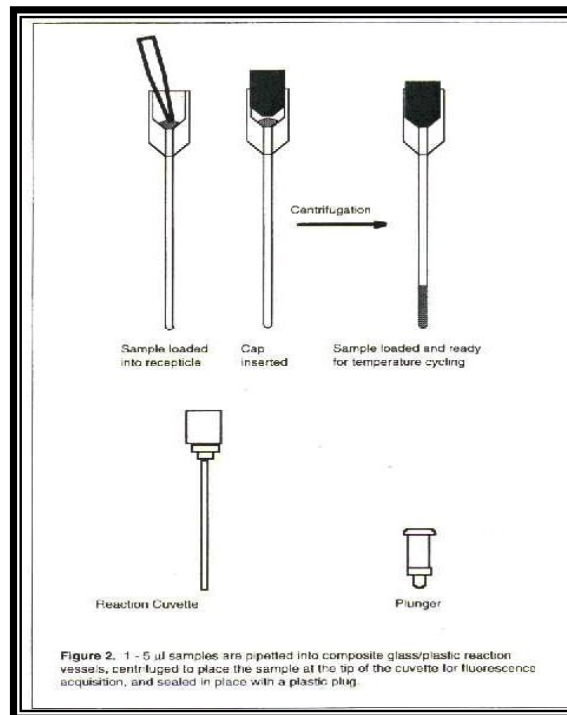
многу стабилни, само 6% од активноста се губат по 30 амплификациски циклуси.

Во почетокот на амплификацијата, во реактивната смеша има денатурирана DNA, прајмери и *Taq*Man проби. Неврзаните *Taq*Man проби продуцираат минимален (background) флуоресцентен сигнал. По врзувањето на прајмерите (анилирање) се зголемува имитацијата на флуоресценцијата (слика 3). За време на елонгацијата се' повеќе *Taq*Man проби се врзуваат за новосинтетизираната DNK, што постојно се монитира. Флуоресценцијата се мери по секој циклус.



Слика 3. Флуоресценција со *Taq*Man проби

Амплификацијата се врши во стаклени капилари (слика 4) кои се перфектни капиларни садови за ултрабрза термоциклична употреба заради високиот однос површина/волумен. Капиларите имаат надворешен дијаметар од 1,5 mm и должина од 3 cm, можат да држат волумен од 5-20 µl.



Слика 4. Стаклени капилари

Во реакцијата се користи ензимот PLATINUM[®] *Taq* DNA полимераза (Life Technologies). Таа е рекомбинирана *Taq* DNA полимераза, за која е врзан специфичен инхибитор заради што е неактивна. Во тек на денатурацијата, на 94⁰С ензимот се активира, со што се овозможува автоматски "hot-start" на реакцијата. На овој начин се зголемува сензитивноста, специфичноста, чистотата на продуктот, повисока концентрација и елиминација на неспецифични амплификации. Ензимот се добива во пакувања со концентрација од 5 U/µl. Ензимската активност е околу 500 bp за 10 sec.

4.2.3.1. Екстракција на DNA се вршеше со DNA кит за изолација PURGENE (Gentra Systems, 2000) според протоколот за брза изолација (околу 25 min.) на DNA од 300 µl полна крв, на следниот начин:

- **Лиза на крвни клетки и бактерии**

Во микроепрувети од 1,5 ml се става 300 µl полна крв и 900 µl RBC Lysis Solution. Се инкубира 1 min. на собна температура, се превртува нежно 10 пати за време на инкубацијата. Ако се работи со свежа крв, земена во рок

од 1 h, се зголемува времето на инкубација на 3 min. за да се обезбеди комплетна лиза на еритроцитите.

Се центрифугира 20 sec. на 14.000 x g. Се исфрла со пипета супернатантот колку е можно повеќе оставајќи видлив талог од белите крвни клетки и околу 10-20 µl од останатата течност.

Епруветите силно се мешаат на вортекс 10 sec. да се ресуспендираат белите крвни клетки и останатата течност, што овозможува лиза на белите крвни клетки. Талогот од белите крвни клетки по мешањето со вортексот не се гледа.

Се додава 300 µl Cell Lysis Solution на ресуспендираните клетки и се пипетира горе доле да се лизираат клетките. Примероците се стабилни во Cell Lysis Solution најмалку 18 месеци на собна температура.

Се меша со вортекс 20 sec. Се ставаат епруветите на 80°C/5 min. за да се лизираат бактериите.

- **Преципитација на протеините**

Се додава 100 µl Protein Precipitation Solution на клеточниот лизат претходно оладен на собна температура. Се меша силно со вортекс со голема брзина 20 sec. за да се измеша Protein Precipitation Solution едномерно со клеточниот лизат.

Се центрифугира на 14.000 x g 1 min. Преципитираните протеини формираат цврст, темнокафеав талог. Ако протеинскиот талог не е цврст, се повторува постапката со инкубација од 5 min. на мраз.

- **DNA преципитација**

Се префрла супернатантот во кој се наоѓа DNA (оставајќи го протеинскиот преципитиран талог) во чисти микроепрувети од 1,5 ml во кои има 300 µl 100% Isopropanol (2-propanol).

Се мешаат примероците со превртување 50 пати.

Се центрифугира на 14.000 x g 1 минута, по што DNA ќе биде видлива како мал бел талог.

Се истура супернатантот и епруветите брзо се сушат на чиста попивна

хартија. Се додава 300 µl Ethanol и се превртуваат тубите неколку пати за да се измие DNA талогот.

Се центрифугира на 14.000 x g 1 min. Внимателно се истура Ethanol-от, за да не се истури и талогот.

Се превртуваат и сушат епруветите на чиста попивна хартија за 5 sec.

- **DNA хидратација** се врши на следниот начин:

Се додава 100 µl DNA Hydration Solution (ако количината на DNA во примерокот е 10 µg, добиената концентрација ќе биде 10 µg/100 µl т.е. 100 µg/ml).

Се меша на вортекс со средна брзина 5 sec.

Се инкубираат примероците на 65⁰C 5 min за да се забрза хидратацијата.

Се меша на вортекс 5 sec. со средна брзина и центрифугира кратко да се собере примерокот на дното на епруветата.

DNA се чува на 4⁰C. За долготрајно чување, примероците се чуваат на температура од -20⁰C до -80⁰C.

4.2.3.2. Подготовка на Master Mix за RAPID PCR

dH ₂ O	6µl	
10 X PCR Buffer	2µl	500mM Tris-HCl, 50 mM MgCl
10 X dNTP	2µl	2mM од секоја dNTP
Forward primer	2µl	5µM
Reverse primer	2µl	5µM
TaqMan Probe	2µl	0.3µM
Taq Platinum	2µl	0.4 единици

4.2.3.3. Изведување на PCR

Се земаат онолку епендорфови епруветки колку има примероци за испитување и уште по една за негативна и за позитивна проба .

Во секоја епрувета се става по 38 µl (за две проби, се работи во дупликат) од master mixot, а потоа се додава:

1. Во првата епрувета 2 µl H₂O (негативна контрола)
2. Во втората 2µl од позитивна контрола
3. Во следните по 2µl (2ng DNA) од примерокот што се испитува.

Значи, во секоја епандорф епрувета има по 40 μl , и од нив по 20 μl се ставаат во капиларните цевчиња, кои потоа се ставаат во RAPID цајклерот и се стартува PCR. Реакцијата е изведувана во две фази (**Two steps PCR**):

1. на 94°C/2min (еден циклус),
2. потоа 60°C/20 sec. и 94°C/0sec. (40 циклуси).

4.2.4. КУЛТИВИРАЊЕ

Во текот на изработката на студијата, во AFIP-Washington DC, во безбедносна комора од IV степен култивиравме 90 примероци на полиморфонуклеарни клетки (ПМК) во течен медиум BBL™SEPTI-CHEK™ (BECTON DICKINSON). ПМК ги добивавме по центрифугирање на 6-8 ml крв во Vacutainer®CPT™ (Cell preparation tube with Sodium Citrate) епрувети. Епруветите беа центрифугирани со 1.500-1.800 вртежи во min. во тек на 20 min. ПМК по центрифугирањето се наоѓаат над полиестерскиот гел, се префрлаат во чисти епрувети и потоа се испираат со PBS (фосфатен пуфер) кој се дополнува во епруветите до 15 ml. Епруветите се превртуваат 5 пати за да се измеша содржината и потоа се центрифугира со 300 вртежи во min. во тек на 15 минути. Уште еднаш се ресуспендира талогот од клетки со PBS до 10 ml, епруветите се превртуваат пет пати за да се измеша содржината и потоа се центрифугира со 300 вртежи во минута во тек на 10 min. Се аспирира и се отфрла супернатантот. Во талогот се наоѓаат полиморфонуклеарни клетки во кои, во случај на бруцелоза, се очекува да се наоѓаат бруцелите.

Медиумите беа инкубирани на 37°C во време до четири недели. Секоја недела се вршеше пресадување од течните медиуми на *Brucella* агар кој се инкубираше, на 37°C во атмосфера од 10% CO₂ во време до една недела. Колониите беа кружни, бледи, слабо опалесцентни со пречник од 2-6 mm. Од пораснатите колонии е правен препарат по Грам и PCR. Во понатамошниот тек на испитувањето направена е и биохемиска типизација на изолираните бруцели според конвенционални методи.

4.2.5. СТАТИСТИЧКА ОБРАБОТКА

4.2.5.1. Вредноста на ELISA во однос на стандардните серолошки методи, проценка на најпогодниот пар прајмери, проценка на дијагностичката вредност на PCR е вршена врз основа на χ^2 -тестот, со табели 2X2, со еден степен на слобода (CC), со ниво на значајност (сигнификантност) $\chi^2 > 3,84$, $p < 0,05$, со употреба на Yates-ова корекција (Petz, 1985).

4.2.5.2. **Сензитивноста** на ELISA и PCR е одредувана (со калкулација на наодите од болните) по формулата:

$$\text{Сензитивност} = \left[\frac{\text{ВП}}{\text{ВП} + \text{ЛН}} \right] \times 100$$

ВП=вистински позитивни кај болни, ЛН=лажно негативни кај болни

4.2.5.3. **Специфичноста** на ELISA и PCR е одредувана (со калкулација на наодите од здравите) по формулата:

$$\text{Специфичност} = \left[\frac{\text{ВН}}{\text{ВН} + \text{ЛП}} \right] \times 100$$

ВН=вистински негативни кај здрави, ЛП=лажно позитивни кај здрави

4.2.5.4. **Репродуктибилноста** на ELISA е пресметувана по тестирање на примероците во дупликат со помош на одредување на стандардна девијација (СД) според формулата :

$$\text{СД} = \frac{\sum d}{2N}$$

$\sum d$ = збир од разликите на ОДс меѓу дупликатите

N= број на парни серуми

4.2.5.5. **Прогностичката (предиктивна) вредност на позитивните тестови (ПВ⁺)** е одредувана според формулата:

$$\text{ПВ}^+ = \left[\frac{\text{ВП}}{\text{ВП} + \text{ЛП}} \right] \times 100$$

ВП=вистински позитивни кај болни, ЛП=лажно позитивни кај здрави

4.2.5.6. **Прогностичката (предиктивна) вредност на негативните тестови (ПВ⁻)** е одредувана според следните формули (Dawson-Saunders, 1990):

$$\text{ПВ}^- = \left[\frac{\text{ВН}}{\text{ВН} + \text{ЛН}} \right] \times 100$$

ВН=вистински негативни кај здрави, ЛН=лажно негативни кај болни

5. РЕЗУЛТАТИ

5.1. Резултати од серолошките реакции

Во текот на студијата со серолошки тестирања (ELISA, BAV, Wright и Coombs) испитани се вкупно 1.100 серуми. Добиените резултати се интерпретирани според описот даден во методите на работа.

Просечните вредности на ОД (оптичките дензитети) добиени со ELISA при одредувањето на *Brucella* IgM и IgG антителата, во однос на кои се толкувани резултатите, се прикажани на табела 3.

Табела 3. Просечни вредности на оптичките дензитети

	IgM		IgG	
<i>Горна граница</i>	ОД	0,412	ОД	0,346
<i>Cut Off</i>	ОД	0,375	ОД	0,315
<i>Долна граница</i>	ОД	0,337	ОД	0,283

5.1.1. Резултати од серолошките реакции кај лица со акутна бруцелоза

5.1.1.1. Серолошки резултати при прием во болница

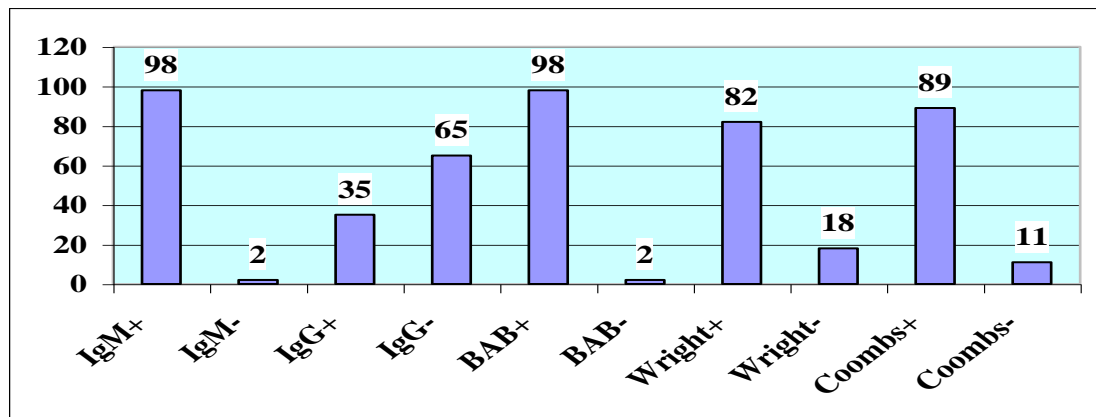
Од оваа група се испитани серуми од вкупно 100 пациенти. Резултатите на серолошките реакции се прикажани на табела 4 и графикон 2.

Табела 4. Серолошки резултати при прием во болница

I серуми			ELISA IgM (1)			ELISA IgG (2)		
			+	+/-	-	+	+/-	-
			98^{2,4,5}	1	1	35^{1,3,4,5}	1	64
BAV (3)	+	98²	98	0	0	35	0	63
	-	2	0	1	1	0	1	1
Wright (4)	+	82^{1,2}	81	1	0	35	1	46
	-	18	17	0	1	0	0	18
Coombs (5)	+	89^{1,2}	87	1	1	35	1	53
	-	11	11	0	0	0	0	11

^{1,2,3,4,5} - Статистичка значајност ($\chi^2 > 3,84$, $p < 0,05$)

Графикон 2. Серолошки резултати при прием во болница



Од испитаните 100 серуми, BAB позитивни резултати се утврдени кај 98, негативни само два, Wright беше позитивен кај 82 а негативен кај 18, и Coombs беше позитивен кај 89 а негативен кај 11 серуми.

ELISA IgM беше позитивен кај 98 серуми, два серуми беа негативни (еден претходно +/-, при повторно испитување негативен).

ELISA IgG беше позитивен кај 35, негативен кај 65 (претходно еден +/-, при повторно испитување негативен).

Според резултатите добиено е следното:

- Резултатите на ELISA IgM во однос на BAB тестот беа идентични. Со ELISA IgM се добиени статистички значително поголем број позитивни наоди во однос на Wright ($\chi^2=12,48$, $p<0,05$) и Coombs тестот ($\chi^2=5,26$, $p<0,05$).
- Со ELISA IgG се добиени статистички значително помал број на позитивни наоди во однос на BAB ($\chi^2=47,68$, $p<0,05$), Wright ($\chi^2=43,56$, $p<0,05$) и Coombs тестот ($\chi^2=59,6$, $p<0,05$), како и во однос на ELISA IgM ($\chi^2=86,26$, $p<0,05$).

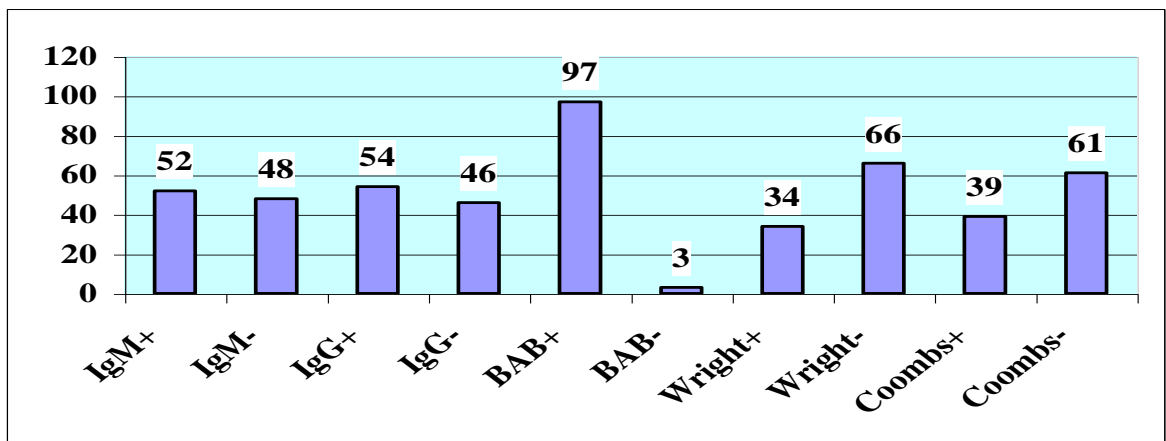
5.1.1.2. Серолошки резултати по завршеток на лекување

Од оваа група испитани се вкупно 100 серуми по завршетокот на лекувањето во траење од 42 дена. Резултатите од серолошките испитувања се прикажани на табела 5 и графикон 3.

Табела 5. Серолошки резултати по завршеток на лекување

II серуми			ELISA IgM (1)			ELISA IgG (2)		
			+	+/-	-	+	+/-	-
			52 ^{3,4}	1	47	53 ^{3,4,5}	2	45
BAB (3)	+	97 ^{1,2}	52	1	44	53	2	42
	-	3	0	0	3	0	0	3
Wright (4)	+	34 ^{1,2}	34	0	0	32	1	1
	-	66	18	1	47	21	1	44
Coombs (5)	+	39 ²	39	0	0	35	2	2
	-	61	13	1	47	18	0	43

^{1,2,3,4,5} - Статистичка значајност ($\chi^2 > 3,84$, $p < 0,05$)



Графикон 3. Серолошки резултати по завршеток на лекување

Од испитаните 100 серуми, BAB позитивни резултати се утврдени кај 97 серуми, негативни три, Wright беше позитивен кај 34 а негативен кај 66, и Coombs беше позитивен кај 39 а негативен кај 61 серум. ELISA IgM беше позитивен кај 52 серуми, негативен кај 48 (претходно еден +/-, при повторно

испитување негативен), ELISA IgG позитивен кај 54, негативен кај 46 (претходно два +/-, при повторно испитување еден +, еден -).

Според резултатите добиено е следното:

- Бројот на позитивни ELISA IgM наоди во однос на BAB тестот е статистички значително помал ($\chi^2=50,94$, $p<0,05$), во однос на Wright тестот статистички е значително поголем ($\chi^2=5,89$, $p<0,05$) и во однос на Coombs нема статистички значајна разлика ($\chi^2=2,9$, $p>0,05$).
- Со ELISA IgG се добиени статистички значително помал број на позитивни наоди во однос на BAB тестот ($\chi^2=47,68$, $p<0,05$), но статистички значително поголем број во однос на Wright ($\chi^2=7,32$, $p<0,05$) и Coombs тестовите ($\chi^2=3,92$, $p<0,05$).
- Не е добиена статистички значајна разлика во добисните наоди за ELISA IgM и ELISA IgG ($\chi^2=0,076$, $p>0,05$).

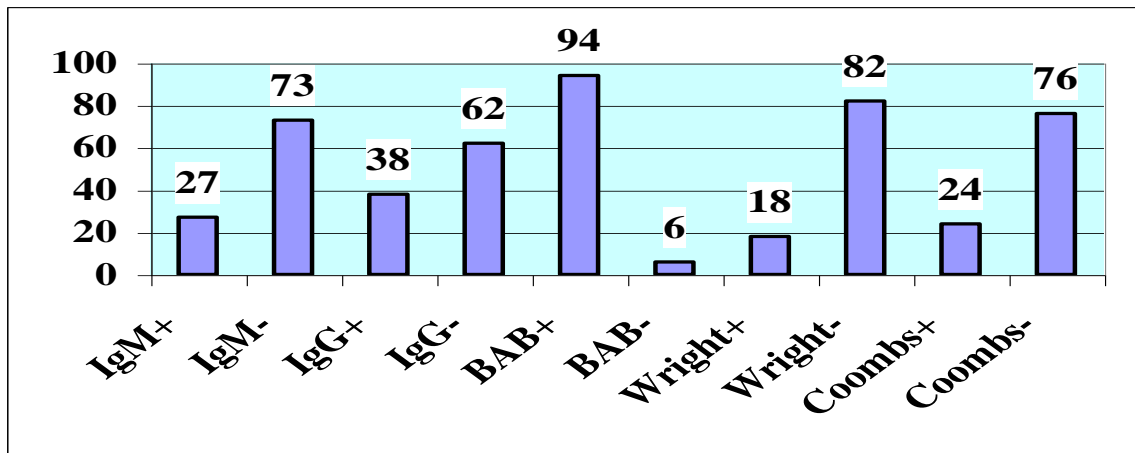
5.1.1.3. Серолошки резултати три месеци по завршеток на лекување

Од оваа група се испитани вкупно 100 серуми. Резултатите од серолошките испитувања се прикажани во табела 6 и графикон 4.

Табела 6. Серолошки резултати три месеци по завршеток на лекување

III серуми			ELISA IgM (1)			ELISA IgG (2)		
			+	+/-	-	+	+/-	-
			27 ³	3	70	38 ³	1	61
BAB (3)	+	94 ^{1,2}	27	3	64	38	1	55
	-	6	0	0	6	0	0	6
Wright (4)	+	18	18	0	0	12	1	5
	-	82	9	3	70	26	0	56
Coombs (5)	+	24	15	3	6	20	1	3
	-	76	12	0	64	18	0	58

^{1,2,3,4,5} - Статистичка значајност ($\chi^2 > 3,84$, $p < 0,05$)



Графикон 4. Серолошки резултати три месеци по завршеток на лекувањето

BAB позитивни резултати се утврдени кај 94 серуми, негативни кај шест, Wright беше позитивен кај 18 а негативен кај 82, и Coombs беше позитивен кај 24 а негативен кај 76 серуми. ELISA IgM беше позитивен кај 27 серуми, 73 беа негативни (претходно три +/-, при повторно испитување сите негативни), ELISA IgG позитивен кај 38, негативен кај 62 (претходно еден +/-, при повторно испитување негативен).

Според резултатите добиено е следното:

- Бројот на позитивни ELISA IgM наоди во однос на BAB тестот е статистички значително помал ($\chi^2=97,44$, $p<0,05$), но во однос на Wright ($\chi^2=1,8$, $p>0,05$) и Coombs ($\chi^2=0,098$, $p>0,05$) тестовите нема статистички значајна разлика.
- Со ELISA IgG се добиени статистички значително помал број на позитивни наоди во однос на BAB ($\chi^2=67,38$, $p<0,05$) тестот и статистички значително поголем број позитивни наоди во однос на Wright ($\chi^2=8,94$, $p<0,05$) и Coombs тестовите ($\chi^2=3,94$, $p<0,05$).
- Нема статистички значителна разлика во наодите на ELISA IgG во однос на ELISA IgM ($\chi^2=2,28$, $p>0,05$).

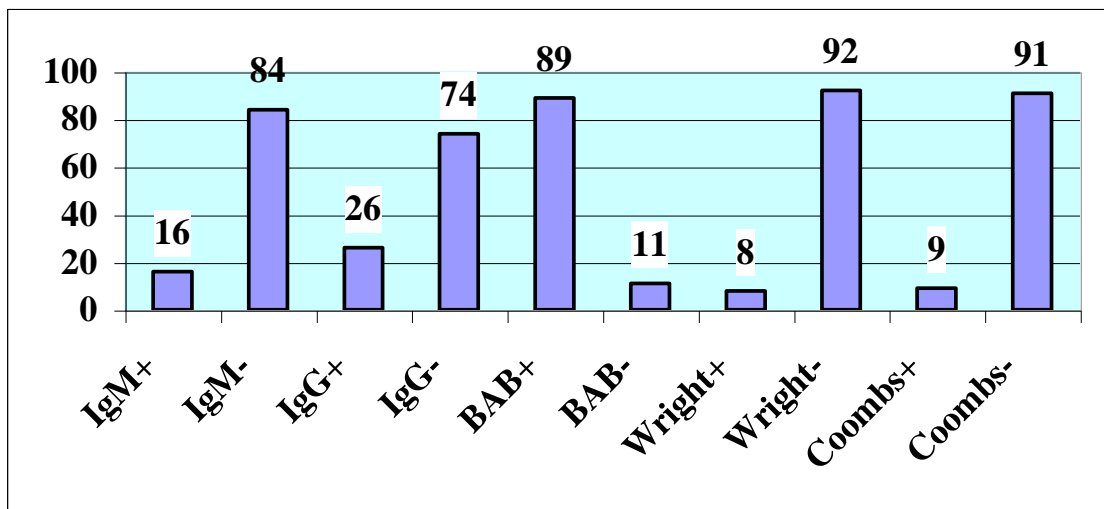
5.1.1.4. Серолошки резултати шест месеци по завршеток на лекување

Од оваа група се испитани вкупно 100 серуми. Резултатите од серолошките испитувања се прикажани во табела 7 и графикон 5.

Табела 7. Серолошки резултати шест месеци по завршеток на лекување

IV серуми			ELISA IgM (1)			ELISA IgG (2)		
			+	+/-	-	+	+/-	-
			16 ³	3	81	26 ^{3,4,5}	1	73
BAB (3)	+	89 ^{1,2}	13	3	73	26	1	62
	-	11	3	0	8	0	0	11
Wright (4)	+	8 ²	5	3	0	7	1	0
	-	92	11	0	81	19	0	73
Coombs (5)	+	9 ²	6	3	0	9	0	0
	-	91	10	0	81	17	1	73

^{1,2,3,4,5} - Статистичка значајност ($\chi^2 > 3,84$, $p < 0,05$)



Графикон 5. Серолошки резултати шест месеци по завршеток на лекување

BAB позитивни резултати се утврдени кај 89 серуми, негативни 11, Wright беше позитивен кај осум а негативен кај 92, и Coombs беше позитивен кај девет а негативен кај 91 серум. ELISA IgM беше позитивен кај 16 серуми, негативен кај 84 (претходно три +/-, при повторно испитување сите негативни), ELISA IgG позитивен кај 26, негативен кај 74 (претходно еден +/-, при повторно испитување негативен).

Според резултатите добиено е следното:

- Бројот на позитивни ELISA IgM наоди во однос на BAB тестот е статистички значително помал ($\chi^2=103,9$, $p<0,05$), но во однос на Wright ($\chi^2=2,32$, $p>0,05$) и Coombs ($\chi^2=1,64$, $p>0,05$) нема статистички значителни разлики.
- Со ELISA IgG се добиени статистички значително помал број на позитивни наоди во однос на BAB тестот ($\chi^2=78,6$, $p<0,05$), но статистички значително поголем број во однос на Wright ($\chi^2=10,24$, $p<0,05$) и Coombs ($\chi^2=8,84$, $p<0,05$) тестовите.
- Бројот на позитивни ELISA IgG наоди во однос на ELISA IgM нема статистички значителни разлики ($\chi^2=2,43$, $p>0,05$).

5.1.2. Резултати од серолошки реакции кај лица лекувани од бруцелоза со продолжителни симптоми

Од оваа група се испитани 200 серуми, по два од секое лице на растојание од шест месеци ("први" серуми при првото земање и "втори" серуми при земањето по шест месеци). Најчести симптоми на кои се жалеа болните беа: болки во зглобови, болки во половината, потење, истоштеност.

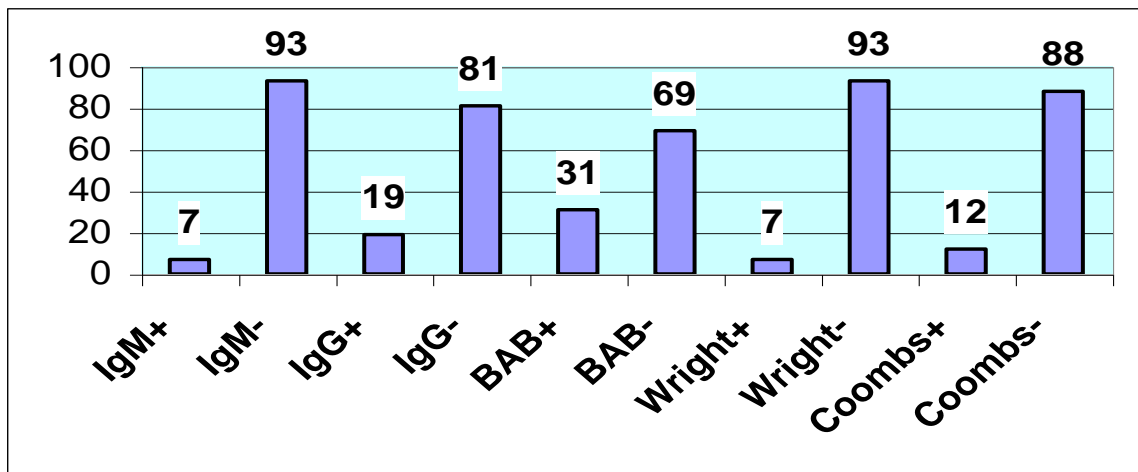
5.1.2.1. Резултати од серолошки реакции кај лица лекувани од бруцелоза со продолжителни симптоми - "први серуми"

Од оваа група се испитани вкупно 100 серуми. Добиените резултати се прикажани во табела 8 и графикон 6.

Табела 8. Серолошки резултати кај лица лекувани од бруцелоза со симптоми - "први серуми"

I серуми од порано болни со симптоми			ELISA IgM (1)			ELISA IgG (2)		
			+	+/-	-	+	+/-	-
			7 ^{2,3}	1	92	19 ^{1,4}	0	81
BAB (3)	+	31 ¹	7	1	23	19	0	12
	-	69	0	0	69	0	0	69
Wright (4)	+	7 ²	3	0	4	7	0	0
	-	93	4	1	88	12	0	81
Coombs (5)	+	12	5	0	7	12	0	0
	-	88	2	1	85	7	0	81

^{1,2,3,4,5} - Статистичка значајност ($\chi^2 > 3,84$, $p < 0,05$)



Графикон 6. Серолошки резултати кај лица лекувани од бруцелоза со симптоми, "први серуми"

BAB позитивни резултати се утврдени кај 31 серуми, негативни 69, Wright беше позитивен кај седум а негативен кај 93, и Coombs беше позитивен кај 12 а негативен кај 88 серуми. ELISA IgM беше позитивен кај седум серуми, негативен кај 93 (претходно еден +/-, при повторно испитување негативен), ELISA IgG позитивен кај 19, негативен кај 81.

Според резултатите добиено е следното:

- Бројот на позитивни ELISA IgM наоди во однос на BAB е статистички значително помал ($\chi^2=17,8$, $p<0,05$), а во однос на Wright (ист резултат) и Coombs ($\chi^2=0,92$, $p>0,05$) тестовите нема статистички значајна разлика.
- Со ELISA IgG не се добиени статистички значителни разлики во однос на BAB ($\chi^2=2,48$, $p>0,05$) и Coombs ($\chi^2=1,36$, $p>0,05$) тестовите но статистички значително поголем број во однос на Wright тестот ($\chi^2=5,32$, $p<0,05$).
- Бројот на позитивни ELISA IgG наоди во однос на ELISA IgM е статистички значително поголем ($\chi^2=5,32$, $p<0,05$).

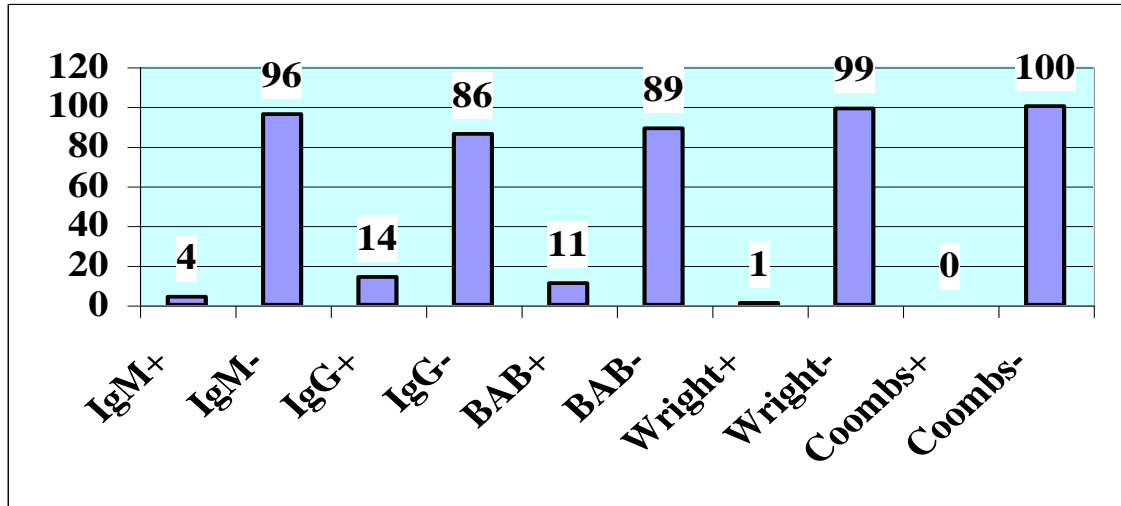
5.1.2.2. Резултати од серолошки реакции кај лица лекувани од бруцелоза, со продолжителни симптоми -"втори серуми"

Од оваа група се испитани вкупно 100 серуми. Добиените резултати се прикажани во табела 9 и графикон 7.

Табела 9. Серолошки резултати кај лица лекувани од бруцелоза, со симптоми-"втори серуми"

II серуми од порано болни со симптоми			ELISA IgM (1)			ELISA IgG (2)		
			+	+/-	-	+	+/-	-
			4	0	96	14 ^{4,5}	0	86
BAB (3)	+	11	4	0	7	11	0	0
	-	89	0	0	89	3	0	86
Wright (4)	+	1 ²	1	0	0	1	0	1
	-	99	3	0	96	13	0	85
Coombs (5)	+	0 ²	0	0	0	0	0	0
	-	100	4	0	96	14	0	86

^{1,2,3,4,5} - Статистичка значајност ($\chi^2 > 3,84$, $p < 0,05$)



Графикон 7. Серолошки резултати кај лица лекувани од бруцелоза, со симптоми, "втори серуми"

BAB позитивни резултати се утврдени кај 11 серуми, негативни 89, Wright беше позитивен кај еден а негативен кај 99, и Coombs беше негативен кај сите 100 серуми. ELISA IgM беше позитивен кај четири серуми, негативен кај 96, ELISA IgG позитивен кај 14, негативен кај 86.

Според резултатите добиено е следното:

- Бројот на позитивни ELISA IgM наоди во однос на BAB ($\chi^2=2,58$, $p>0,05$), Wright ($\chi^2=0,82$, $p>0,05$) и Coombs ($\chi^2=2,29$, $p>0,05$) нема статистички значајна разлика.
- Со ELISA IgG се добиени еднакви наоди со BAB тестот, но статистички значително поголем број позитивни наоди во однос на Wright ($\chi^2=7,16$, $p<0,05$) и Coombs ($\chi^2=9,6$, $p<0,05$).
- Бројот на позитивни ELISA IgG наоди во однос на ELISA IgM не е статистички значаен ($\chi^2=2,58$, $p>0,05$).

5.1.3. Резултати од серолошки реакции кај лица лекувани од бруцелоза, без симптоми

Од оваа група се испитани 200 серуми, по два од секое лице на растојание од шест месеци ("први" серуми при првото земање и "втори" серуми при земањето по шест месеци). Овие лица по терапијата немале никакви симптоми и се чувствувале здрави.

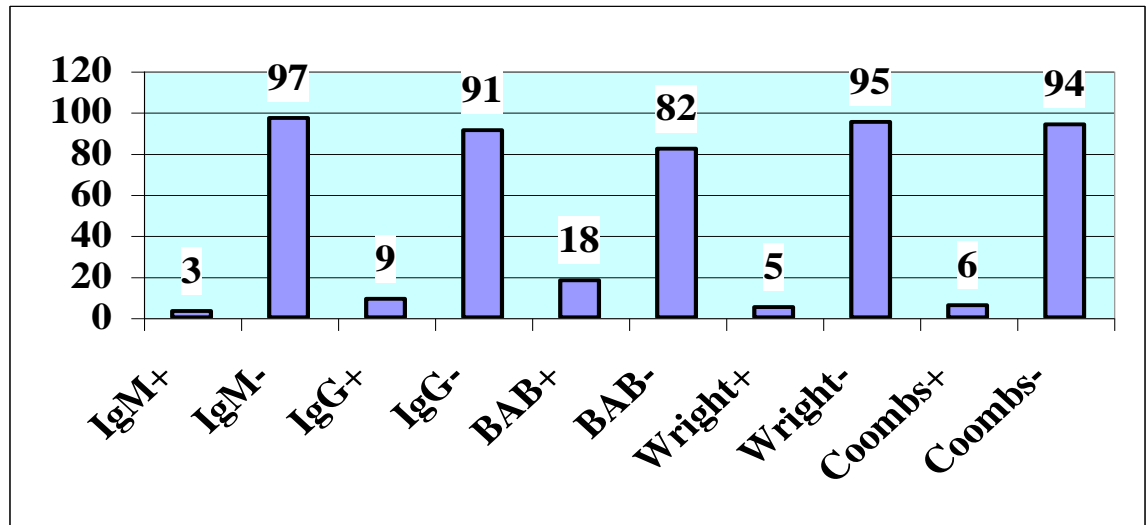
5.1.3.1. Резултати од серолошки реакции кај лица лекувани од бруцелоза, без симптоми-"први серуми"

Од оваа група се испитани 100 серуми. Добиените резултати се прикажани во табела 10 и графикон 8.

Табела 10. Серолошки резултати кај лица лекувани од бруцелоза, без симптоми-"први серуми"

I серуми од порано болни без симптоми			ELISA IgM (1)			ELISA IgG (2)		
			+	+/-	-	+	+/-	-
			3 ³	0	97	9	0	91
BAB (3)	+	18 ¹	3	0	15	9	0	9
	-	82	0	0	82	0	0	82
Wright (4)	+	5	3	0	2	5	0	0
	-	95	0	0	95	4	0	91
Coombs (5)	+	6	3	0	3	6	0	0
	-	94	0	0	94	3	0	91

^{1,2,3,4,5} - Статистичка значајност ($\chi^2 > 3,84$, $p < 0,05$)



Графикон 8. Серолошки резултати кај лица лекувани од бруцелоза, без симптоми, први серуми

BAB позитивни резултати се утврдени кај 18 серуми, негативни кај 82, Wright беше позитивен кај пет а негативен кај 95, и Coombs беше позитивен кај шест а негативен кај 94 серуми. ELISA IgM беше позитивен кај три серуми, негативен кај 97, ELISA IgG позитивен кај девет, негативен кај 91.

Според резултатите добиено е следното:

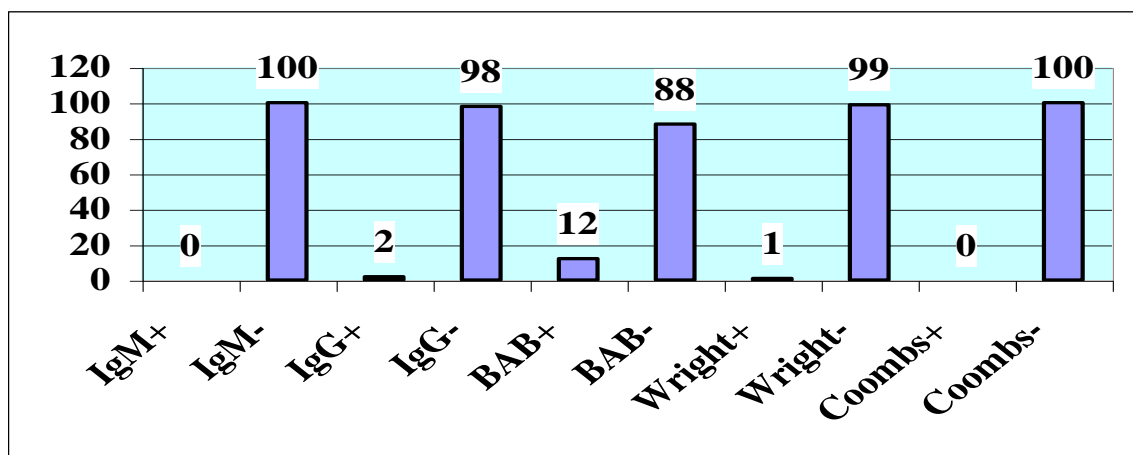
- Бројот на позитивни ELISA IgM наоди во однос на BAB тестот е статистички значително помал ($\chi^2=10,4$, $p<0,05$), а во однос на Wright ($\chi^2=0,12$ $p>0,05$) и Coombs ($\chi^2=0,49$, $p>0,05$) тестовите нема статистички значајна разлика.
- Со ELISA IgG не се добиени статистички значителни разлики во наодите во однос на BAB ($\chi^2=2,72$, $p>0,05$), Wright ($\chi^2=0,68$, $p>0,05$) и Coombs ($\chi^2=0,28$, $p>0,05$) тестовите.
- Бројот на позитивни ELISA IgG наоди во однос на ELISA IgM не е статистички значително различен ($\chi^2=2,2$, $p>0,05$).

5.1.3.2. Резултати од серолошки реакции кај лица лекувани од бруцелоза, без симптоми - "втори серуми" прикажани се во табела 11 и графикон 9.

Табела 11. Серолошки резултати на лица лекувани од бруцелоза, без симптоми - "втори серуми"

II серуми од порано болни без симптоми			ELISA IgM (1)			ELISA IgG (2)		
			+	+/-	-	+	+/-	-
			0 ³	0	100	2 ³	0	98
BAB (3)	+	12 ^{1,2}	0	0	12	2	0	10
	-	88	0	0	88	0	0	88
Wright (4)	+	1	0	0	1	1	0	0
	-	99	0	0	99	1	0	98
Coombs (5)	+	0	0	0	0	0	0	0
	-	100	0	0	100	2	0	98

^{1,2,3,4,5} - Статистичка значајност ($\chi^2 > 3,84$, $p < 0,05$)



Графикон 9. Серолошки резултати кај лица лекувани од бруцелоза, без симптоми, "втори серуми"

BAB позитивни резултати имаше кај 12 серуми, негативни кај 88, Wright беше позитивен кај еден а негативен кај 99, и Coombs беше негативен кај сите 100 серуми. Резултатите на ELISA IgM во однос на IgG нема разлика ($\chi^2=2,02$, $p>0,05$), во однос на BAB тестот беа статистички значително пониски ($\chi^2=11,64$, $p<0,05$), а во однос на Wright ($\chi^2=1,00$, $p>0,05$) и Coombs (исти наоди) немаше разлики. Резултатите на ELISA IgG во однос на BAB тестот беа статистички значително пониски ($\chi^2=6,2$, $p<0,05$) а во однос на Wright ($\chi^2=0,32$, $p>0,05$) и Coombs ($\chi^2=2,02$, $p>0,05$), немаше статистички значителни разлики.

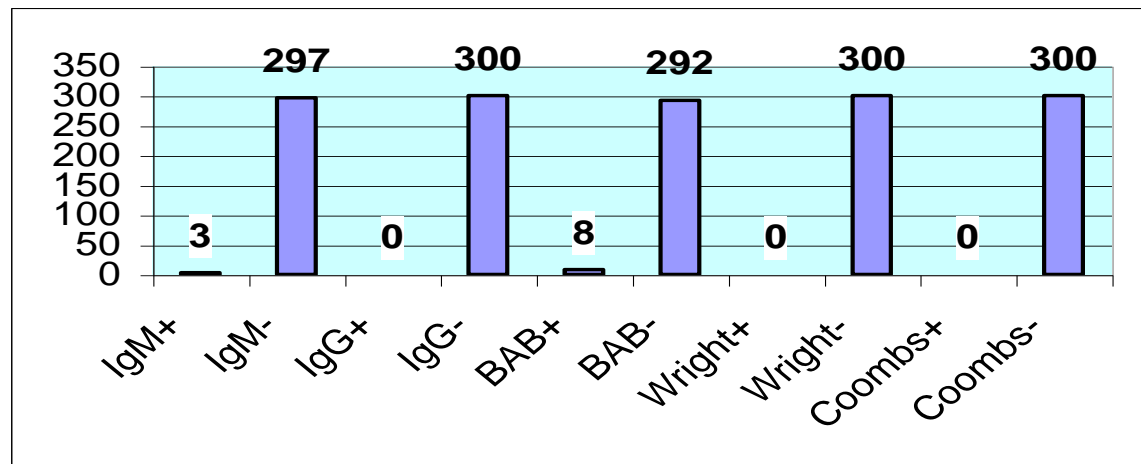
5.1.4. Резултати од серолошки реакции кај здрави доброволни крводарители

Од оваа група се испитани серуми на 300 доброволни крводарители, војници на Армијата на Република Македонија. Добиените резултати се прикажани во табелата 12 и графикон 10.

Табела 12. Серолошки резултати кај здрави крводарители

Серуми од здрави крводарители			ELISA IgM (1)			ELISA IgG (2)		
			+	+/-	-	+	+/-	-
			3	3	294	0	5	295
BAB (3)	+	8	3	3	2	0	5	3
	-	292	0	0	292	0	0	292
Wright (4)	+	0	0	0	0	0	0	0
	-	300	3	3	294	0	5	295
Coombs (5)	+	0	0	0	0	0	0	0
	-	300	3	3	294	0	5	295

^{1,2,3,4,5} - Статистичка значајност ($\chi^2 > 3,84$, $p < 0,05$)



Графикон 10. Серолошки резултати на здрави крводарители

BAB позитивни резултати се утврдени кај осум серуми, негативни кај 292, Wright и Coombs беа негативни кај сите 300 серуми (три серуми со низок, негативен титар 1/20 и два серуми со 1/40), ELISA IgM беа позитивни (лажно) кај три а негативни кај 297 серуми (претходно три +/- а при повторно сите негативни), ELISA IgG беше негативна кај сите 300 серуми (претходно пет +/- а при повторно тестирање сите негативни).

5.2. Резултати од PCR

Во табелите 13, 14, 15, 16, 17 и графиконите 11, 12, 13, 14, 15, прикажани се резултатите на примероци крв од вкупно 330 пациенти.

5.2.1. PCR резултати од болни со акутна бруцелоза

Испитани се примероци крв од вкупно 100 болни со акутна бруцелоза, земани при приемот во болница. Резултатите се прикажани во табела 13 и графиконите 11 и 12.

Табела 13. PCR резултати кај болни со акутна бруцелоза

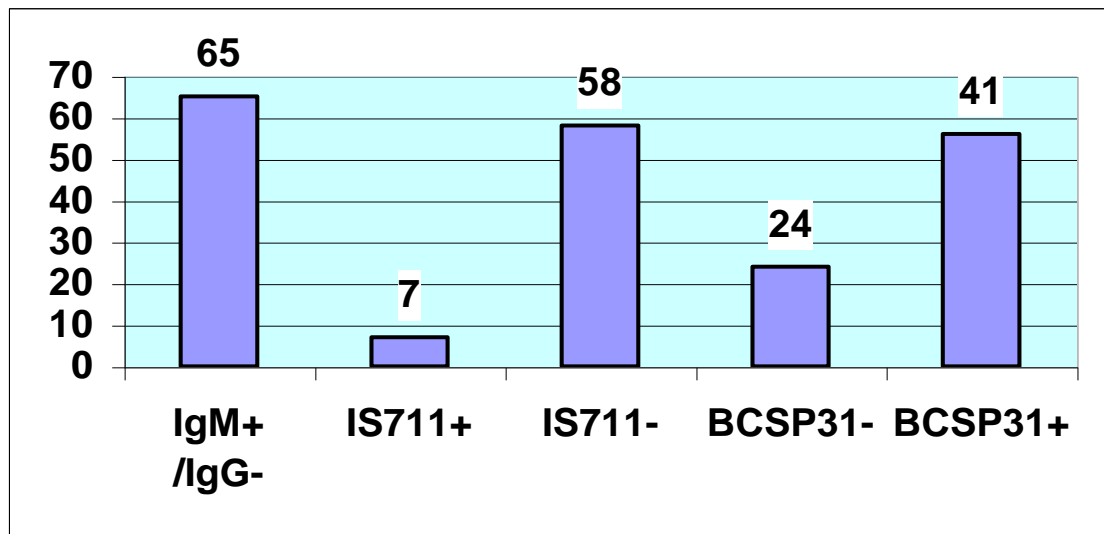
Болни со акутна бруцелоза			PCR			
			IS 711		BCSP31	
			+	-	+	-
			10*	90	56*	44
ELISA	IgM+/IgG-	65	7*	58	41*	24
	IgM+/IgG+	35	3*	32	15*	20

* Статистичка значајност ($\chi^2 > 3,84$, $p < 0,05$)

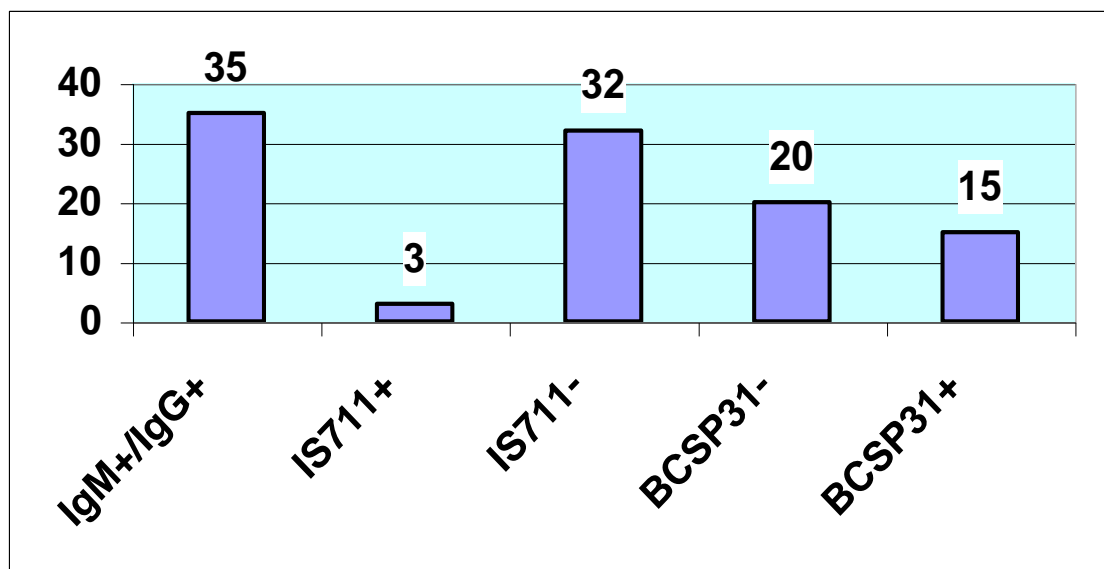
Од вкупно 100 испитани примероци на болни во акутна фаза на болеста добиени се следните наоди: со *IS711* прајмерите 10 позитивни и 90 негативни, а со *BCSP31* прајмерите 56 позитивни и 44 негативни, што е статистички значајно ($\chi^2=45,6$, $p<0,05$).

Кај пациентите со IgM+/IgG- (примероци добиени на самиот почеток на болеста, се' уште не се развиле IgG антители), добиени се следните наоди: со *IS711* прајмерите седум позитивни и 58 негативни, а со *BCSP31* прајмерите 41 позитивни и 24 негативни, што е статистички значајно ($\chi^2=35,8$, $p<0,05$). ELISA резултатите на овие серуми во однос на резултатите на PCR со подобриот пар прајмери (*BCSP31*) се статистички значително повисоки ($\chi^2=27,02$, $p<0,05$).

Кај пациентите со IgM+/IgG+ (примероци од болни каде болеста почнала нешто порано и веќе се развиле и IgG антители) добиени се следните наоди: со *IS711* прајмерите три позитивни и 32 негативни, а со *BCSP31* прајмерите 15 позитивни и 20 негативни, што е статистички значајно ($\chi^2=9,04$, $p<0,05$). ELISA резултатите на овие серуми во однос на резултатите на PCR (*BCSP31*) се статистички значително повисоки ($\chi^2=25,26$, $p<0,05$).



Графикон 11. PCR резултати на болни со акутна бруцелоза, IgM+/IgG-



Графикон 12. PCR резултати на болни со акутна бруцелоза, IgM+/IgG+

5.2.2. PCR резултати кај лица лекувани од бруцелоза со продолжителни симптоми

Испитани се примероци крв од вкупно 100 лекувани лица со продолжителни симптоми по лекувањето. Најчести симптоми на кои се жалела болните беа: болки во зглобови, болки во половината, потење, истоштеност. Резултатите се прикажани во табела 14 и графиконите 13, 14 и 15.

Табела 14. PCR резултати на лекувани болни со продолжителни симптоми

Лекувани од бруцелоза со симптоми			PCR			
			IS 711		BCSP31	
			+	-	+	-
			2*	98	17*	83
ELISA	IgM-/IgG-	77	0	77	0	77
	IgM-/IgG+	16	1*	15	11*	5
	IgM+/IgG+	7	1*	6	6*	1

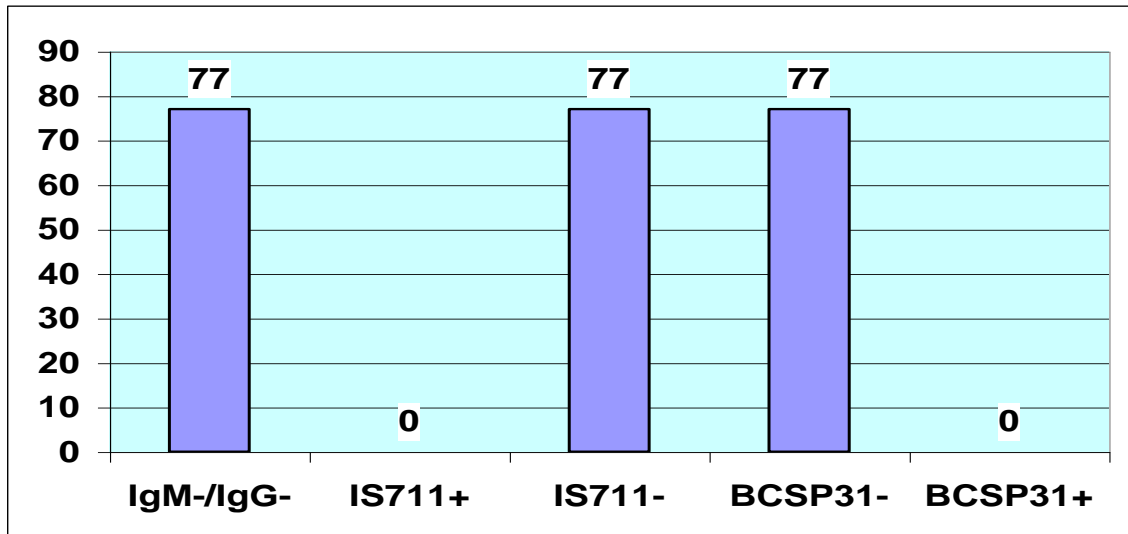
* Статистичка значајност ($\chi^2 > 3,84$, $p < 0,05$)

Од вкупно 100 испитани примероци на лекувани пациенти со продолжителни симптоми добиени се следните наоди: со *IS711* прајмерите два позитивни и 98 негативни, а со *BCSP31* прајмерите 17 позитивни и 83 негативни, што е статистички значајно ($\chi^2=11,38$, $p<0,05$).

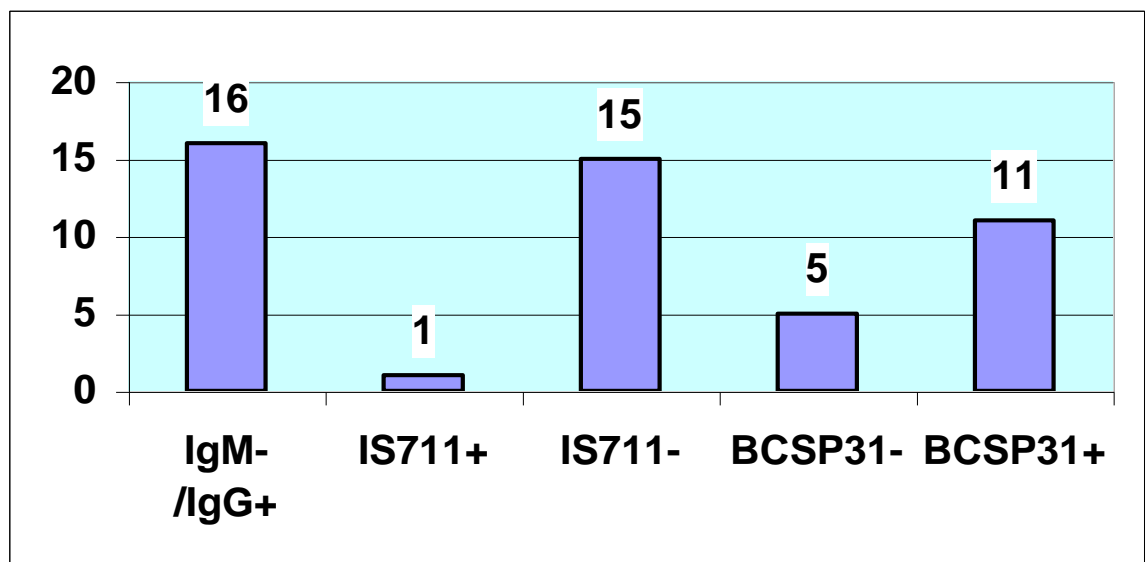
Кај пациентите со IgM-/IgG- добиени се следните наоди: со *IS711* прајмерите ниеден позитивен и 77 негативни, со *BCSP31* прајмерите исто така ниеден позитивен и 77 негативни.

Кај пациентите со IgM-/IgG+ добиени се следните наоди: со *IS711* прајмерите еден позитивен и 15 негативни, а со *BCSP31* прајмерите 11 позитивни и пет негативни, што е статистички значајна разлика ($\chi^2=10,78$, $p<0,05$). ELISA резултатите на овие серуми во однос на резултатите на PCR (*BCSP31*) не се статистички значително различни ($\chi^2=3,78$, $p>0,05$).

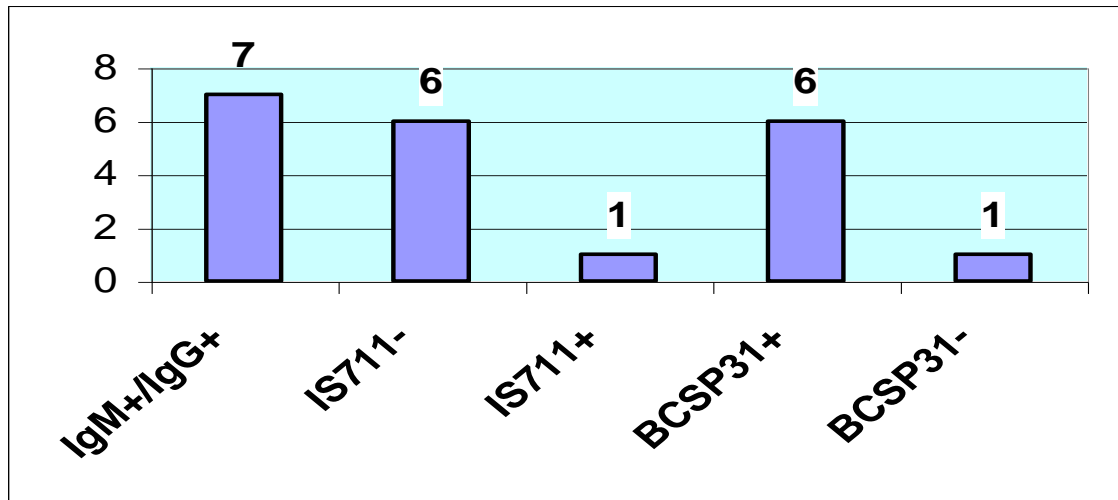
Кај пациентите со IgM+/IgG+ добиени се следните наоди: со *IS711* прајмерите еден позитивен и шест негативни, а со *BCSP31* прајмерите шест позитивни и еден негативен, што е статистички значајно ($\chi^2=4,56$, $p<0,05$). ELISA резултатите на овие серуми во однос на резултатите на PCR (*BCSP31*) не се статистички значително различни ($\chi^2=1,76$, $p>0,05$).



Графикон 13. PCR резултати кај лекувани болни, со продолжителни симптоми, IgM-/IgG-



Графикон 14. PCR резултати кај лекувани болни, со продолжителни симптоми, IgM-/IgG+



Графикон 15. PCR резултати кај лекувани болни, со продолжителни симптоми, IgM+/IgG+

5.2.3. PCR резултати кај лица лекувани од бруцелоза, без симптоми

Испитани се примероци крв од вкупно 100 лекувани лица без симптоми по лекувањето. Резултатите се прикажани во табела 15.

Табела 15. PCR резултати на лекувани болни без симптоми по лекувањето

Лекувани од бруцелоза, без симптоми			PCR			
			IS 711		BCSP31	
			+	-	+	-
			0	100	2	98
ELISA	IgM-/IgG-	91	0	91	0	91
	IgM-/IgG+	6	0	6	0	6
	IgM+/IgG+	3	0	3	2	1

Од вкупно 100 испитани примероци на лекувани болни без симптоми добиени се следните наоди: со *IS711* прајмерите ниједен позитивен и 100 негативни, а со *BCSP31* прајмерите два позитивни и 98 негативни, што не е статистички значајно ($\chi^2=2,02$, $p>0,05$).

Кај пациентите со IgM-/IgG- добиени се следните наоди: со *IS711* прајмерите ниеден позитивен и 91 негативни, со *BCSP31* прајмерите исто така ниеден позитивен и 91 негативни.

Кај пациентите со IgM-/IgG+ добиени се следните наоди: со *IS711* прајмерите ниеден позитивен и шест негативни, а со *BCSP31* прајмерите ниеден позитивни и шест негативни.

Кај пациентите со IgM+/IgG+ добиени се следните наоди: со *IS711* прајмерите ниеден позитивен и три негативни, а со *BCSP31* прајмерите два позитивни и еден негативен, што не е статистички значајно ($\chi^2=3$, $p>0,05$).

5.2.4. PCR резултати кај здрави лица

Испитани се 30 примероци крв, по еден примерок од 30 здрави лица, доброволни крводарители, војници на Армијата на Република Македонија. Резултатите се прикажани во табела 16.

Табела 16. PCR резултати кај здрави лица

Здрави			PCR			
			<i>IS 711</i>		<i>BCSP31</i>	
			+	-	+	-
			0	30	0	30
ELISA	IgM-/IgG-	30	0	30	0	30
	IgM+/IgG-	0	0	0	0	0
	IgM+/IgG+	0	0	0	0	0
	IgM-/IgG+	0	0	0	0	0

Сите примероци на здравите лица беа серолошки негативни а исто така PCR негативни и со *IS711* и *BCSP31* прајмери.

5.2.5. PCR резултати кај чисти култури на *Brucella*

Од култивирани 90 примероци на ПМК добиени се 16 (17%) изолати на *Brucella melitensis*. Сите изолати беа потврдени со RAPID PCR (специфичност 100% и сензитивност 100%) . Добиен е лимит на детекција од 100 fg DNA (околу 20 бактерии).

6. ДИСКУСИЈА

Во Република Македонија до 1980 година бруцелозата не била значајно заболување, но од тогаш се јавува во епидемиска форма. Во периодот од 1980 до 2000 година регистрирани се вкупно 8.225 случаи, од кои, во последните шест години (1995-2000) околу 3.500. Болеста е регистрирана во секоја општина во Републикава (Sokolovski et al., 1997). Во првите години од почетокот на епидемијата, искуствата и познавањата на болеста во однос на епидемиологијата, патогенезата, терапијата, превенцијата и дијагностиката беа доста скромни. Последниве години дијагнозата се поставува релативно брзо а терапијата е најчесто според препораките на WHO. Поставувањето на дијагнозата се врши врз основа на епидемиолошката анкета, клиничката слика и серолошките тестови.

6.1. Серолошки испитувања

Класичните серолошки испитувања се изведуваат според препораките на референтни центри (Robertson et al., 1980; Alton et.al. 1986; Sokolovski, 1990; 1992; 1994). Класични серолошки тестови се: 1. BAV тест (RBT, Brucelloslide test), 2. Wright тест (тест на бавна аглутинација во епрувети), 3. Coombs тест (анти-хуман глобулински тест), 4. РВК (реакција на врзување на комплемент) и 5. 2-Меркаптоетанол тест. Во лабораториите низ Републиката најчесто се користат BAV и Wright, а само во некои е воведен и Coombs тестот. Серолошката дијагностика на хуманата бруцелоза во Републикава од почетокот е усовршена и потоа пренесена и низ другите лаборатории од страна на проф. д-р Боривоје Соколовски и неговиот тим. Единствено во микробиолошката лабораторија на Центарот на военоздравствени установи

се изведува и 2-Меркаптоетанол тестот, воведен во 1996 година (Taleski, 1996; 1997a). Покрај класичните техники на изведување на наброените тестови, усвоени се и микротехники на истите при кои се употребува значително помали количини на антигени (Nikolovski 1990; Taleski 1997b).

IgM се појавува неколку дена по инфекцијата, титарот брзо расте и достигнува највисоко ниво (пик) во третиот месец од болеста, по што титарот опаѓа. IgG се појавуваат по две до три недели од инфекцијата, со највисок титар во шестиот месец од почетокот на заболувањето. Титарот на IgG останува повишен најмалку една година кај нелекувани болни, додека кај адекватно лекувани обично исчезнуваат за шест месеци. Одржувањето на повишен титар на IgG антителата може да е условено од присуство на витални интраклеточни бруцели во RES или во други фокуси (WHO, 1986; Mikolich et al., 1990). При релапси расте титарот на IgG а титарот на IgM не се менува. IgG и IgA антителата можат да бидат присутни и повеќе години по инфекцијата, а IgM се најдени само кај околу 33% случаи со хронична бруцелоза (James, 1998). Кај пациенти со прележана бруцелоза, 12 месеци по терапијата, Ariza со сор. (1992) утврдил постоење на 25% IgM и 89% IgG позитивни наоди. Прецизно утврдување на нивото на IgM и IgG антителата е неопходно за одредување на фазата на болеста, текот на болеста и следење на одговорот на антибиотскиот третман. Со постоечките серолошки тестови тешко може да се утврди постоењето на една од хроничните форми на бруцелоза, и заради создавањето на неаглутиниращки IgG и IgA антитела. Особено е голем проблемот при постоење на симптоми кај пациентите по завршетокот на лекувањето од бруцелоза, кога клиничарот тешко може да се одлучи дали е потребен или не понатамошен антибиотски третман.

Објавени се трудови во врска со употребата на ELISA во дијагностиката на анималната бруцелоза, при што главно се одредувани IgG антитела. ELISA првпат е воведена во дијагностиката на анималната бруцелоза во Австралија и Канада, и се покажала како посензитивна но помалку специфична од РВК тестот (Alton et al., 1986; Nielsen et al., 1996). Користејќи модификации на ELISA методот, Nielsen со сор. (1989) добил сензитивност од 100% и специфичност 96-98%. За надминување на проблемот во разлику-

вање на инфицирани од вакцинирани животни, како и проблемот со вкрстени реактивните антитела кои даваат лажно позитивни резултати, Nielsen и Macmillan го разработиле и вовеле методот на компететивна ELISA (с-ELISA), кај која со употреба на моноклонски антитела се одредуваат антибруцелозни IgG антитела (Nielsen et al., 1989; Adams, 1990). Има неколку студии во кои с-ELISA е користена и во дијагностика на хуманата бруцелоза при што се покажала како посензитивна и поспецифична од класичните тестови (Lucero et al., 1999; Taleski et al., 1997c).

Покрај утврдување на специфичните антитела во серумот, можно е нивно докажување и во млеко, особено во збирно млеко од повеќе примероци (пул). Бошњаковски и сор. (1997) докажале можност на дијагностицирањето на само еден позитивен примерок во пул од 200 кравји, 100 овчи или 100 козји примероци млеко.

Од моментот на пријавувањето на докторатот до пред две години ELISA китовите беа "in-house" подготвувани китови, вакви испитувања се правела само во одредени лаборатории а методите не беа стандардизирани.

На состанокот на Работната група на WHO која работела на проблемот на дијагностика на хуманата бруцелоза, одржан на 6-7 септември 1993 година (WHO, 1993), формирана е осумчлена група со цел да се стандардизира ELISA методот, а извештај се' уште не е доставен.

Врз ELISA резултатите можат да влијаат (Wright et al., 1990):

1. Типот на полистиренската микроплоча;
2. Чистотата на антигенот S-LPS. Освен S-LPS во некои лаборатории како антиген се користени јагленохидратни и протеински антигени;
3. Видот на ензимскиот супстрат;
4. Употреба на поликлонски/моноклонски антитела;
5. Работната концентрација на коњугатот.

Во 1995 година за прв пат во Република Македонија се направени ELISA испитувања во дијагностика на хуманата бруцелоза (Бошњаковски и Талески) на Ветеринарниот институт во Скопје. Добиени се задоволителни

резултати кои не се објавени. Според достапната литература, на просторот на Балканот тоа беа првите ELISA испитувања.

ELISA методот има висока сензитивност и специфичност во утврдувањето на IgM и IgG (и IgA) антитела во серумот на болни со акутна и хронична бруцелоза како и релапси на болеста (Araj et al., 1988b; Piffareti et al., 1987; Krteva et al., 1999). Barbudhe и сор. (1994) во ELISA студија на 80 серуми утврдиле сензитивност од 89% и специфичност од 77%, што биле сигнификантно повисоки во однос на Wright тестот. Colmenero и сор. (1994) во проспективна студија кај 50 акутни болни утврдиле сензитивност 90% за IgM и 68% за IgG. Araj и сор. во 1986 година објавиле резултати од студија на 173 пациенти во која утврдиле специфичност и сензитивност на ELISA IgM и IgG од 98%, а две години подоцна во една поголема студија на 573 серуми утврдиле специфичност и сензитивност на ELISA IgM и IgG од 100% (Araj et al., 1986; 1988). Лажно негативните резултати добиени со класичните тестови заради неаглутинарачките антитела и феноменот прозоне (отсуство на аглутинација заради вишок на антитела), бил надминат со ELISA тестовите. ELISA го минимизира ризикот од вкрстени реакции (Gazaro et al., 1989) а специфичноста и сензитивноста при ниски титри на другите реакции биле поголеми.

6.1.1. Серолошки резултати кај болни со акутна бруцелоза

6.1.1.1. Сензитивност и специфичност

Во направените испитувања кај лицата со акутна бруцелоза добиени се статистички значајни разлики (значајно поголем број позитивни наоди) на резултатите на ELISA во однос на класичните серолошки реакции ($p < 0,05$). Специфичноста и сензитивноста на ELISA може да се одреди според титарот на IgM антителата при приемот на болните, затоа што како резултат на понатамошниот развој на болеста и влијанието на антибиотската терапија доаѓа до значајни промени на односите на IgM и IgG антителата. Во овие испитувања добивме сензитивност на ELISA IgM од 98% и специфичност од

100 %, додека со класичните серолошки реакции (ВAB сензитивност од 98%, специфичност од 97%, Wright сензитивност од 82% и специфичност од 100%, и Coombs сензитивност 89% и специфичност од 100%. Сензитивноста на ELISA IgM во однос на Wright и Coombs е статистички значајно повисока ($p<0,05$). Резултатите на ВAB тестот се високи и шест месеци од почетокот на болеста, без оглед на клиничкиот одговор кон антибиотскиот третман, заради што нема значење во следењето на болеста и може да се користи само како скрининг метод.

6.1.1.2. Прогностичка (предиктивна) вредност

Позитивната прогностичка (предиктивна) вредност за ELISA IgM е 98%, како и негативната прогностичка вредност 98%, што претставува степен на доверба во позитивните односно негативните резултати. Позитивната прогностичка вредност за Wright е 82%, а негативната прогностичка вредност 84,7%. Позитивната прогностичка вредност за Coombs е 89%, а негативната прогностичка вредност 90%.

6.1.2. Серолошки резултати кај лекувани болни со симптоми

Во направените испитувања кај лекувани лица со симптоми, добиени се статистички значајни разлики (значајно поголем број позитивни наоди) на резултатите на ELISA во однос на класичните серолошки реакции ($p<0,05$). Кај овие болни значењето е во одредувањето на IgG антителата кои се индикатори за хроничитет или релапс на болеста. И кај првите и кај вторите серуми, кај овие болни позитивен титар на IgG антителата е статистички значајно повисок од IgM антителата, а исто така и поголем е бројот на позитивни резултати во однос на класичните реакции. Со одредувањето на ELISA IgG антителата од првите серуми, откриени се 19 болни со хроничитет /релапс за разлика од класичните реакции со кои се откриени само пет вакви болни. Од вторите серуми на овие болни, по нивниот третман, утврдено е

опаѓање на титарот на IgG антителата, но позитивни наоди сè уште имаше кај 11 болни со ELISA а само еден со класичните реакции.

6.1.3. Серолошки резултати кај лекувани болни без симптоми

Кај лекувани лица без симптоми на болеста по лекувањето не е најдена статистички значајна разлика во бројот на позитивни ELISA IgG резултати во однос на ELISA IgM и во однос на класичните реакции. Кај првите серуми се најдени девет IgG позитивни, а кај вторите само два позитивни. На овие лице не им е давана терапија, и позитивните треба да се следат до негативизирање на резултатите.

6.1.4. Серолошки резултати кај здрави крводарители

Од вкупно испитани 300 здрави крводарители, со ELISA се најдени лажно позитивни резултати кај три лица, а со класичните реакции кај пет лица се најдени титри до 1/40. Во некои земји со значајни проблеми со бруцелозата правени се скрининг испитувања на крводарители. Во една таква студија направена во Аргентина, на 1.075.051 случаи нашле 0,94% позитивни серуми за бруцелоза (Bianco et al., 1993). Заради слични резултати добиени и во други земји, но на помал број случаи, некои предлагаат задолжително тестирање на крвта на крводарителите заради опасноста од пренесување бруцелоза преку трансфузија. Нашите ELISA резултати од 1% (лажно) позитивни наоди укажуваат дека се' уште нема потреба за воведување, покрај задолжителните испитувања, и на скрининг испитувања на крвта на крводарителите за бруцелоза.

6.1.5. Репродуктибилност:

За одредување на репродуктибилноста, направени се испитувања во дупликат на 30 позитивни (IgM+/IgG+) и 30 (IgM-/IgG-) негативни серуми. Сите наоди (позитивни и негативни) беа исти во парните испитувања, при што се добија следните просечни разлики на оптичките дензитети (ОД):

$\text{IgM}^+ = 0,155$; $\text{IgM}^- = 0,054$; $\text{IgG}^+ = 0,134$ и $\text{IgG}^- = 0,036$.

Употребувајќи ја формулата (Brew et al., 1995):

$$\boxed{\text{СД} = \Sigma(d)/2H}$$

$\Sigma(d)$ = збир на разликите на ОД

H = број на парни серуми

добиели се следните стандардни грешки на стандардни девијации:

$$\text{СД}^{\text{IgM}^+} = 30 \times 0,155 / 2 \times 30 = \mathbf{0,077} \quad (1 \text{ СД} = 0,077, \quad 2 \text{ СД} = 0,154, \quad 3 \text{ СД} = 0,231)$$

$$\text{СД}^{\text{IgG}^+} = 30 \times 0,134 / 2 \times 30 = \mathbf{0,067} \quad (1 \text{ СД} = 0,067, \quad 2 \text{ СД} = 0,134, \quad 3 \text{ СД} = 0,201)$$

$$\text{СД}^{\text{IgM}^-} = 30 \times 0,054 / 2 \times 30 = \mathbf{0,027} \quad (1 \text{ СД} = 0,027, \quad 2 \text{ СД} = 0,054, \quad 3 \text{ СД} = 0,081)$$

$$\text{СД}^{\text{IgG}^-} = 30 \times 0,036 / 2 \times 30 = \mathbf{0,018} \quad (1 \text{ СД} = 0,018, \quad 2 \text{ СД} = 0,036, \quad 3 \text{ СД} = 0,054)$$

Во интервалите од: ± 1 СД припаѓаат 68,26% од резултатите, ± 2 СД 95,44% и во интервалот од ± 3 СД 99,73% од резултатите. Малите отстапувања на резултатите на парните серуми укажуваат на висока репродуктивност на ELISA резултатите. Тоа значи голема сигурност и доверба во точноста на резултатите при изведување само по едно тестирање за еден серум.

6.2. PCR

Полимераза верижна реакција (PCR) е револуционерен метод на молекуларната биологија за *in vitro* амплификација на специфични DNA секвенци. Овој метод овозможува утврдување на бараниот дел од генетската информација и правење од него милиони копии кои потоа лесно можат да се идентификуваат. PCR е откриена, развиена, именувана и патентирана од Kary Mullis и неговите соработници (Saiki et al., 1985), вработени во американската биотехнолошка фирма Cetus Corporation (Rosche, 1992; Innis et al., 1990).

Набрзо по откривањето, PCR е воведена (меѓу првите во Европа) во лабораториска дијагностика во Центарот за генетски инженеринг и биотехнологија, при Македонската академија на науките и уметностите (МАНУ) од страна на Академик проф. д-р Ѓорѓи Ефремов (Efremov et al., 1991a; 1991b).

Во првите PCR реакции опишани од Saiki и сор. (Saiki et al., 1985), употребуван е Klenow фрагмент на DNA полимераза на *Escherichia coli*. Овој ензим е термолабилен заради што свеж морал да се додава во секој циклус по денатурацијата и хибридизацијата на прајмерите. Со воведувањето на термостабилниот ензим *Taq* полимераза (добиеен од бактеријата *Thermus aquaticus*, микроорганизам најден во топлиите извори на САД во националниот парк Yellowstone) овозможена е автоматизација на реакцијата (Saiki et al., 1988). Perkin-Elmer-Cetus пред околу две години воведува нова термостабилна *Taq* полимераза (Ampli*Taq*GoldTM), која се добива како инактивирана, а се активира со загревање на температура од 80-95⁰С за време од 10 min. Со оваа полимераза е овозможено претходно мешање на сите реагенси на собна температура, и "hot-start" на PCR, при што специфичноста на амплифицираните продукти е значително зголемена (Efremov, 1998). Во нашите испитувања користевме Platinum®*Taq* DNA Polimerase (Life-technologies), која е рекомбинирана *Taq* DNA Polimerase, што во својот комплекс има и соодветни антители кои ја инхибираат полимеразната активност. Platinum®*Taq* DNA Polimerase се активира на 94⁰С, т.е. на температурата на

денатурација. Со ова е овозможен автоматски "*hot start*" на PCR реакцијата, со што се зголемува сензитивноста и специфичноста и избегнување на неспецифични амплификации. Ензимската активност на Platinum®*Taq* DNA Polymerase за фрагмент до 100 bp е 0 sec, 100-200 bp 5 sec, 200-400 bp 10 sec, 400-600 bp 15 sec, што значи дека останатото време од секој циклус (97%) е загуба на време.

PCR е процес кој се одвива во три фази:

1. Денатурација на DNA;
2. Врзување на прајмерите;
3. Екстензија со помош на *Taq* полимеразата.
 - Во првата фаза, на температура од 94°C се раскинуваат слабите водородни врски меѓу базите на двојната верига на DNA, со што се раздвојува на две единечни вериги.
 - Во втората фаза прајмерите (преден и заден) се врзуваат на единечните вериги на комплементарните секвенци. Прајмерите се мали, синтетизирани едноврижни секвенци DNA, долги 18-30 бази (Rosche, 1992; Taylor, 1992; Efremov et al., 1998), составени од 50-60% G+C (Innis et al., 1990). Прајмерите не смеат да бидат комплементарни за да не се врзат меѓу себе. Тие мора да се уникатни, т.е. да ги има само во геномот кој се докажува (Ruano et al., 1995). Температурата на врзувањето на прајмерите е 40-60°C, и зависи од должината и базните секвенци на прајмерите.
 - Во третата фаза ензимот *Taq* полимераза, почнувајќи од 3' крајот на прајмерите, додава нуклеотиди комплементарни на основните единечни вериги (на температура од 72°C), при што настануваат двојни вериги на DNA, идентични на почетната. Теоретски, по 20 вакви циклуси се добиваат милион копии на бараната DNA, по 30 циклуси милијарда копии, но во пракса потребни се 25 циклуси за добивање милиони копии. Идентификацијата на амплификуваната DNA најчесто се врши со гел-електорфореза. Според протоколот на конвенционалниот PCR, потребни се до три часа за 30 циклуси, додека со RAPID системот кој го користевме во оваа студија може да се

направат 40 циклуси за помалку од 20 min. Покрај тоа што класичните PCR се значително поспори, кај нив се користи 50-100 µl реагенси кои се ставаат во пластични микротуби, заради што температурата во реагенсите не е подеднаква и доцни зад температурата во блокот за загревање. Предности на RAPID PCR се тоа што се користат 20 µl реагенси, се користат стаклени капилари во кои температурата е рамномерна во целиот реагенс и извонредно брзо се пренесува заради големиот однос површина/волумен на капиларите.

PCR реакцијата во RAPID системот е целосно контролирана преку специјален компјутерски софтвер. На лаптоп компјутерот се следи секој циклус на реакцијата и може да се види кога точно се јавува позитивен сигнал (*Real Time PCR*), и по потреба реакцијата може да се прекине. Сите резултати се меморираат во компјутерот и можат поединечно да се анализираат.

PCR има широка примена како во дијагностика на:

- причинители на инфективни заболувања (*Bordetella pertusis*, *Legionella pneumophila*, *HIV*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Mycoplasma pneumoniae*, *Chlamydia trachomatis*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Treponema palidum*, *Helicobacter pylori* и др.);
- детекција на вродени заболувања (хемофилија, леукемиа, цистична фиброза, мускулна дистрофија, таласемии, српаста клеточна анемија и др.);
- рана дијагноза на канцер (леукемија, белодробен канцер, канцер на гради и на колон);
- трансплантација на органи (за одредување на компатибилноста на ткивата на реципиентите и донаторите преку брза проверка на специфични HLA секвенци, минимална резидуална болест);
- судска медицина (утврдување на татковство)
- криминалистика (утврдување на потеклото, припадноста на биолошки материјали);

- еволуција (компарација на археолошки DNA фрагменти со фрагменти на живи растенија и животни).

Геномот на *Brucella* не е секвенциониран до крај. Тој се состои од два циркуларни хромозома: подолг од 2.100 kbp и покус од 1.150 kbp, и приближно 58% GC (Halling, 1997). Во GenBank има околу 50 *brucella* гени (табела 1).

Во литературата се опишани студии во кои се користени прајмери за одредување на: 16S rRNA, (Romero et al., 1995a), *omp-2* генот (Klevezas et al., 1995; Rincon et al., 1997), инсерциската секвенца *IS711* (*IS6501*) (Bricker et al., 1994; 1995), генот *BCSP31* (Matar et al., 1996; Quiro-Ortuno et al., 1997; Morata et al., 1998).

Fekete и сор. (1990) употребувајќи прајмери за амплификација на 635 bp фрагмент на 43 kDa надворешен мембрански протеин, утврдиле ниво на детекција од 0.1 pg DNA (што значи помалку од 100 *brucella* микроорганизми). Romero и сор. (1995b) со одредување на 16S rRNA можеле да детектираат DNA во количина од околу 80 fg (помалку од 20 бактерии). Klevezas и сор. (1995) со амплификација на *omp-2* генот, утврдиле висока сензитивност на PCR во детекција на дури и помалку од 10 *brucella* микроорганизми во 1 ml млеко. Во студијата на Da Costa и сор. (1996) со прајмери за *BCSP31* објавено е ниво на детекција од 13,5 fg.

Во нашето испитување добивме лимит на детекција на *brucella melitensis* DNA со TagMan RAPID PCR од 100 fg, или најмалку 20 бактерии.

Објавени се научни трудови за употребливоста на конвенционалниот PCR во дијагностиката на хуманата бруцелоза, но нема податоци за користење на RAPID PCR во дијагностиката на хуманата бруцелоза од периферна крв.

Во студија на 47 пациенти со бруцелоза, употребувајќи специфични прајмери за *BCSP31*, Quiro-Ortuno и сор. (1997) добиле сензитивност на конвенционален PCR од 100% и специфичност 98,3%. Исто така утврдиле дека не се јавува деградација на DNA во примероци чувани на -20°C шест месеци пред процесирањето. Во нашето испитување ние добивме позитивни резултати и

од примероци чувани на -20°C повеќе од една година, што го потврдува и наодот на претходните автори дека ако DNA е присутна во примерокот долго време не се деградира и може успешно да се детектира со PCR. Во писмото до издавачот како одговор на резултатите на студијата на Quijeto-Ortuno, Navaro и сор. (1999) објавиле резултати од нивна студија на 10 пациенти со бруцелоза и пет здрави лица, при што работејќи според истите методи на Quijeto-Ortuno, добиле сензитивност од 50% и специфичност од 60 %. Romero и сор. во студија во која испитувале млеко на 37 инфицирани крави нашле сензитивност на конвенционалниот PCR од 87,5% и ELISA (за *brucella* антитела) во 98,2% (Romero et al., 1995c).

Со користење на арбитрарни прајмери, т.е. истовремено повеќе прајмери за различните соеви на бруцели, може да се докаже сојот на бруцелите. Во почетокот на студијата користевме прајмери за *B. melitensis*, *B. abortus* и *B. suis*, но добивме позитивни наоди само за *B. melitensis*, која е единствениот причинител на бруцелоза кај испитуваните лица. Заради ова во понатамошниот тек на студијата користевме прајмери и TagMan проби за одредување на делови од *IS711* и *BCSP31* на *B. melitensis*. Должините на ампликоните беа: за *IS711* -134 bp и за *BCSP31* -60 bp.

6.2.1. PCR резултати кај болни со акутна бруцелоза

Во нашата студија на 100 лица болни од акутна бруцелоза, претходно потврдени случаи врз основа на клиничката слика и серолошките наоди со ELISA, добивме PCR позитивни наоди од 10% при користење на парајмери за *IS711* и 56% со прајмери за *BCSP31*. Од пациентите 65 беа на самиот почеток на заболувањето (присутни само IgM) и кај нив PCR беше позитивен во седум случаи (10,7%) за *IS711* и во 41 случај (63%) за *BCSP31*. Кај останатите 35 случаи, пациентите не се примени во самиот почетокот на болеста (присутни и IgM и IgG), позитивен PCR наод имаше кај три (8,6%) за *IS711* и 15 (42,8%) за *BCSP31*. Разликата во бројот на позитивни наоди за *BCSP31* е статистички значајна во зависност од моментот на прием на пациентите т.е. од моментот на земање на примероците на крв. Овие наоди потврдуваат дека бактериемијата со одминување на времето од почетокот на

болеста е се поретка и бруцелите преку полиморфонуклеарите се локализираат во останатите ткива.

Кај оваа форма на бруцелоза бројот на позитивни резултати добиени со ELISA е значително повисок од оној добиен со PCR, затоа што антителата перзистираат значително подолго во крвта од времетраењето на бактериемијата кога PCR е позитивна. PCR е позитивна на самиот почеток на болеста, кога серолошките тестови сè уште негативни, заради што PCR може да претставува единствен начин за рана дијагностика на бруцелозата.

6.2.2. PCR резултати кај лица лекувани од бруцелоза, со продолжителни симптоми

Од испитаните 100 примероци добивме PCR позитивни наоди во два случаи при користење на парајмери за *IS711* (2%), и 17 (17%) со прајмери за *BCSP31*. Со ELISA се добиени 23 позитивни резултати, значително повеќе од оние добиени со PCR. Од седум лица со IgM-/IgG+, шест беа *BCSP31* позитивни, (само едно со *IS711*), со што во овие шест случаи се потврди постоење на хронична бруцелоза.

Хроницитет беше потврден и во 11 случаи (PCR+) со IgM-/IgG+, а кај пет (PCR-) беше исклучен.

Кај 77 лица, со симптоми по лекувањето но со негативни серолошки наоди, (IgM-/IgG-) PCR беше негативна во сите случаи, со што кај сите беше исклучено постоење на бруцелоза.

Во сите 17 случаи со позитивни серолошки и PCR наоди, хроницитетот и потребата за понатамошна антибиотска и симптоматска терапија беше потврдена, а во шест случаи позитивните серолошки наоди кои одеа во прилог на хроницитет не беа потврдени со PCR.

Кај оваа група на пациенти, како и во претходната, бројот на позитивни резултати добиени со ELISA беше повисок од оној добиен со PCR, затоа што титарот на антителата перзистира или расте заради интрацелуларната локализација на бруцелите во различни органи и ткива, а бактеријемијата не е континуирана и не може секогаш да се докаже. Во овие случаи

позитивен наод на PCR со сигурност укажува на хронична бруцелоза или релапс на болеста. Кај негативните наоди со PCR од периферна крв, бруцелите може да се докажат од пунктати на органи или ткива во кои се локализирани.

6.2.3. PCR резултати кај лица лекувани од бруцелоза без симптоми

Во оваа група од вкупно 100 испитани примероци добивме само два позитивни наоди со *BCSP31*, и тоа кај лица со IgM+/IgG+. За овие пациенти беше потребна понатамошна терапија, а кај пациентот со позитивни серолошки наоди, PCR негативен, без симптоми, беше потребно следење на серолошките наоди, но антибиотската терапија не е препорачлива. Кај сите пациенти (вкупно 91) со негативни серолошки (IgG-/IgG-) и негативни PCR наоди се работеше за излекувани лица.

6.2.4. PCR резултати на здрави лица

Сите резултатите од 30 здрави лица беа негативни и со PCR и со ELISA.

6.2.5. Сензитивност и специфичност на PCR

Во оваа студија ги добивме следните показатели за RAPID PCR:

- сензитивност за *IS711* 10%, за *BCSP31* 56%,
- специфичност за *IS711* 100% и за *BCSP31* 100%,
- позитивната прогностичка (предиктивна) вредност за *IS711* 100% и за *BCSP31* 100%, што значи дека PCR позитивните се сигурно позитивни,
- негативната прогностичка (предиктивна) вредност за *IS711* 25% и за *BCSP31* 40,5%, што значи дека и довербата во негативните наоди т.е. непостоење на бруцелоза при PCR негативни наоди не е висока.

Овие резултати укажуваат дека болните не се примани на лекување на самиот почеток на болеста заради ненавремено барање на медицинска помош од нивна страна или заради задоцнета дијагноза. Сензитивноста би била значително повисока во случај на надминување на овој проблем, а PCR

би бил единствен метод за дијагностика во самиот почеток на болеста, пред развивањето сигнификантни титри на антитела кои можат да се докажат со серолошките реакции.

Покрај тоа, за вредноста на резултатите на PCR постојат одредени ограничувачки моменти. При користење на PCR за утврдување на *Brucella* од полна крв, проблемите се јавуваат заради инхибиторното дејство на хемот од еритроцитите (Biotech, 1996). Morata и соп. (1998) утврдиле дека високи концентрации на леукоцитна DNA и компоненти на хемот од еритроцитите можат да ја инхибираат PCR реакцијата. Според нив, овие инхибитори можат ефикасно да се супримираат со зголемување на бројот на миењата на четири или пет и намалување на количината на DNA на вкупно 2 до 4 μg , со што би се избегнале лажно негативни резултати. Во оваа студија во подготовката на Master-mix-от се користени по 2 μg на DNA која се испитуваше. Со посебен метод може од крвта да се издвојат полиморфонуклеарите (ПМК). Ние користевме Vacutainer® CPT (Cell Preparation Tube-BECTON DICKINSON) за издвојување на полиморфонуклеарни клетки од периферна крв. Изолација на DNA се вршеше со DNA кит за изолација PURGENE (Gentra Systems, 2000) според протоколот за брза изолација, со што максимално беа отстранувани евентуалните инхибитори од крвта.

Друг важен момент е што бруцелите се интрацелуларни микроорганизми и тешко може да се одреди моментот на бактериемијата. Можноста за утврдување присуство на бруцели во полиморфонуклеарните клетки на периферната крв (ПМК) на болните ги надминува сите наброени проблеми во врска со изолацијата и идентификацијата. Во литературата има мал број трудови од оваа област.

До денес во нашата Република не е воведена бактериолошка дијагностика на хуманата бруцелоza во рутинска работа. За ова постојат повеќе причини: потребата од посебни услови, специјална опрема, ризикот при работа со *Brucella*, долгото време на инкубација. Често, и при исполнување на сите неопходни услови, особено при хронична бруцелоza, изолацијата не е успешна. Според постоечките податоци, резултатите на позитивна

изолација се многу различни и се движат од 10-90%. Moreno и сор. (1992) кај испитуваните 119 пациенти утврдиле сензитивност на хемокултури од 70%, а просечната должина на инкубација била 13,6 дена. Eissa и сор. (1990) кај 87 пациенти утврдиле сензитивност на хемокултурите од 75%. Shehabi и сор. (1990) во студија на 106 пациенти утврдиле позитивни хемокултури во 44,4% а од коскена срцевина 27,7%. Во последниве години развиени се и се користат модерни системи за хемокултури како што се: API 20 NE (Batchelor et al., 1992), Bact/Alert™, Bactec NR 660 (Yagupski, 1994), Bactec NR 730 (Gamazo et al., 1993), Bactec 9240 (Hussain et al., 1995), VITAL-BioMerieux, но и со нив е потребна најмалку 10-дневна инкубација.

Во секојдневната работа со хемокултури, посебно по воведувањето на автоматски системи за хемокултури во некои лаборатории, не е исклучена можноста од изолација на бруцели. Заради несоодветните услови за работа (немање на безбедносни комори од III/IV степен) постои голема опасност од интралабораториска инфекција на вработените. PCR дава можност за идентификација на бруцелите без опасност по вработените. Исто така, времето на идентификација значително би се скратило, од неколку дена потребни за биохемиски реакции на помалку од еден час. Во текот на студијата во AFIP-Washington DC, во безбедносна комора од IV степен, култивиравме 90 примероци на ПМК во медиумот BBL™SEPTI-CHEK™ (BECTON DICKINSON), при што добивме 16 (17%) изолати на *Brucella melitensis*. Сите изолати беа потврдени со PCR. Со понатамошни биохемиски испитувања потврден е сојот *Brucella melitensis* биотип 3. Единствениот досега изолиран сој на *Brucella* во Македонија, потврден во референтен центар за бруцелоза во Англија, беше *Brucella melitensis* биотип 2.

7. ЗАКЛУЧОЦИ

8.1. ELISA методот е статистички значајно посензитивен во однос на класичните серолошки реакции кај лица со акутна бруцелоза при приемот во болница, три и шест месеци по лекувањето.

8.2. Сензитивноста на ELISA методот е статистички значајно повисока во однос на класичните серолошки реакции, во откривање на хроничитет кај лекувани болни со продолжителни симптоми. За сите овие случаи потребен е продолжен антибиотски третман.

8.3. Сензитивноста на ELISA методот не е статистички значајно различна во однос на класичните серолошки реакции кај лица без симптоми по лекувањето. Ваквите лица треба да се следат до 3 години, т.е. до негативизирање на титрите на антителата. При пораст на титрите (рецидив, релапс) треба да се дава антибиотска терапија.

8.4. Не постои разлика во специфичноста меѓу ELISA методот и класичните серолошки реакции.

8.5. Прогностичките (предиктивни) вредности, т.е. довербата во добиените резултати, на ELISA се статистички значајно повисоки во однос на вредностите на класичните серолошки реакции.

8.6. Резултатите добиени со ELISA се високо репродуктибилни, заради што не е неопходно тестирање во дупликат.

8.7. Добиените ELISA резултати од серумите на здрави крводарители (1% лажно позитивни) укажуваат дека сè уште нема потреба, покрај задолжителните испитувања за одредени заболувања, да се воведат и скрининг испитувања на крвта на крводарителите и за бруцелоза.

8.8. ELISA е високо сензитивен, специфичен и економичен метод, со висок степен на доверба во добиените резултати, се изведува за кратко време, заради што претставува референтен метода во следење на титрите на анти-бруцелозните антителата а со тоа одредување на фазата на болеста и одговорот на антибиотскиот третман.

8.9. Од испитуваните прајмери подобар пар за RAPID PCR, со сензитивност од 56%, специфичност од 100%, позитивна прогностичка вредност од 100% и негативна прогностичка вредност од 40,5% и лимит на детекција од 100 fg DNA, беа прајмерите за утврдување на генот *BCSP31* кој го кодира 31kDa (OMP) надворешниот мембрански протеин на *Brucella melitensis*. Сензитивноста е значително повисока кај примероците на периферна крв кои се земани во почетокот на болеста, кога бактериемијата сè уште била присутна.

8.10. Со ELISA методот добиениот број позитивни наоди е статистички значајно повисок во однос на позитивните наоди PCR затоа што антителата кои се откриваат со ELISA перзистираат долго време по инфекцијата а присуството на *Brucella* DNA (бактериемија) во периферната крв е многу пократко. Позитивните наоди на PCR, при позитивни ELISA наоди, се сигурен показател за акутна односно хронична инфекција, за која е неопходна антибиотска терапија.

8.11. Утврдувањето на *brucella* DNA со RAPID PCR од чисти култури, како и од позитивни хемокултури, се изведува побрзо, поекономично е од стандардните методи на изолација и идентификација, и овозможува избегнување на ризикот за вработените од интралабораториски инфекции.

8.12. Можноста од рутинска примена на ELISA и PCR овозможува надминување на познатите проблеми во дијагностиката на хуманата бруцелоza, значителна помош во лекувањето на болните и во епидемиолошките студии.

8. ЛИТЕРАТУРА

1. Abd-Elzrak M. Brucella optic neuritis. Arch Intern Med 1991; 154(4):776-8.
2. Acocella G, Berttrand A, Boytout J et al. Comparison of three defferent regimens in the treatment of acute brucellosis: a multicentre multinacional study. J Antimicrob Chemother 1989; 23:433-9.
3. Adams GL. Advances in Brucellosis Research. 1990; 306-20.
4. Alausa OK, Brucellosis: socio-ecnomc problems and control in various countries. Trop Geogr Med 1980; 32, 5-11.
5. Allegreti N, Andreis I, Chulo F. Imunoglobulini vo: Imunologija. Shkolska knjiga Zagreb, 1987; 101-28.
6. Alton GG, Jones LM, Angus RD, Verger JM. Techniques for the brucellosis laboratory. Institut National de la Recherche Agronomique, Paris, 1986a; 81-136.
7. Araj GF, Lulu AR, Mustafa MY, Khateeb MI. Evaluation of ELISA in the diagnosis of acute and chronic brucellosis in human beings. J Hyg 1986b; 97(3):457-69.
8. Araj GF, Brown GM, Haj MM, Madhvan NV. Assessment of Brucellosis Card test in screening patients for brucellosis. Epidem Inf 1988a; 100:3, 389-98.
9. Araj GF. Specific antibodies Detected During Relapse of Human Brucellosis. J Inf Dis. 1988b; 918-24.
10. Araj GF, Lulu AR, Khateeb MI, Haj M. Specific IgE response in patients with brucellosis. Epidem Inf 1990; 105. 571-577.
11. Ariza J, Pellicer T, Pallares R et al. Specific antibody profile in human brucellosis. Clin Infect Dis. 1992; 14(1):131-40.
12. ...Aspects actuels des foyers brucelliens reciduels. Med hyg 1990; 154 (4) 776-8.
13. Baily GG, Krahm JB, Drasar BS, Stoker NG. Detection of *Brucella melitensis* and *Brucella abortus* by DNA amplification. J Trop Med & Hyg Aug. 1992; 95 (4): 271-5.
14. Barbuddhe SB, Yadava VK, Singh DK. Detection of IgM and IgG antibodies against *Brucella* by ELISA in humans. J Com Dis. 1994; 26(1):1-5.

15. Barrera C, Mazzolli AB, Pelling C, Stockert JC. Metachromatic staining of human sperm nuclei after reduction of disulphide bonds. *Acta Histochemica* May 1993; 94(2):141-9.
16. Batchelor BI, Brindle RJ, Gilks GF, Selkon JB. Biochemical misidentification of *Brucella melitensis* and subsequent laboratory-acquired infections. *Journal of Hospital Infection* Oct. 1992; 22 (2):159-62.
17. Benet EJ. Brucellosis. Cecil, Textbook of Medicine, 17th ed. WB Saunders Company, Philadelphia 1986; 1614.
18. Bentejac CM, Bertrand G, Bascoul S. Vaccination contre la brucellose humaine bilan sur une periode de 2 ans. *Develop Biol Standard* 1984; 56, 531-5.
19. Bianco RP, Santarelli MT. National serological screening of blood donors for diseases transmitted by transfusion. *Medicina*, Buenos Aires, 1993; 53:6, 491-6.
20. Biolife manual. Second edition 1991; 45.
21. Birtasevic B, Gjorgjevic D, Arsic B at al. Бруцелоза во: Војна епидемиологија. Београд 1989; 318-22.
22. Bosnjakovski J, Mitov D, Naletoski I, Hristovski M. Дијагноза на анималната бруцелоза преку млекото со ЕЛИСА метод. I конгрес на микробиолозите на Македонија, Охрид, 1997; 35-7.
23. Brew S, Perrett L, Stack J at al. Guide to the EIA techniques used in the diagnosis of brucellosis at the CVL Addlestone. Version 6. 1995; 26-7.
24. Bricker BJ, Halling SM. Differentiation of *Brucella abortus* bv.1, 2, and 4, *Brucella melitensis*, *Brucella ovis*, and *Brucella suis* bv. 1 by PCR. *J Clin Microbiol*. 1994; 2660-6.
25. Bricker BJ, Halling SM. Enhancement of the Brucella AMOS PCR Assay for Differentiation of Brucella abortus Vaccine Strains S19 and RB51. *J Clin Microbiol*. 1995; 1640-2.
26. Brinley-Morgan WJ, Corbel MJ. Brucella infections in man and animals in: Topley & Wilson's Principles of bacteriology, Virology and Immunity. Eight ed, Vol 3, Edward Arnold, London-Melbourne-Auckland 1990; 547-70.
27. Bruce D. Notes of the discovery of a microorganism in Malta fever. *Practitioner* 1887; 39, 161.
28. ...Brucellosis in Kuwait. *Wkly Epid Rec* 1984; 20, 154-5.
29. ...Brucellosis in the United States 1965-1974. *J Infect Dis* 1977; 136:2, 312-6.

30. ...Brucellosis surveillance. Center for Diseases Control, Annual summary 1977, 1978.
31. ... Brucellosis in USA. Wkly Epidem Rec 1984; 20, 154-5.
32. ...Brucellosis: A history of the disease and its eradication from cattle in Great Britain, Ministry of Agriculture, London 1983.
33. ...Brucellosis in Britain. Brit Med J 1987; 289, 6448.
34. Buchanan MT, Faber LC. 2-Mercaptoethanol brucella agglutination test: Usefulness for predicting recovery from brucellosis. J Clin Microbiol 1980; 691-3.
35. Centers for Disease Control and National Institutes of Health. Biosafety in microbiological and biomedical laboratories 2nd ed. Washington 1988.
36. Cheers C. Cell Mediated Immunity to Murine Brucellosis and the Role of Cytokines. 50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference. Chicago, Nov 1997; 37-53.
37. Cloeckaert A. Antigens of Brucella. 50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference. Chicago, Nov 1997; 35-43.
38. Colak H, Usluer G, Ozgunes I at al. Comparison of the Wright, Indirect Coombs and Enzyme immunoassay IgG methods for the diagnosis of chronic brucellosis. Microb Bul Jan 1992; 56-60.
39. Colmenero JD, Porras J, Cardenas A at al. Evaluation of the Chromotitre EIA test in the diagnosis of human brucellosis. Enfermedades Infecciosas Micobiologia Clinica Feb 1994; 12 (2):60-5.
40. Colmenero JD. Possible implications of Doxycycline-Rifampin interaction for treatment of brucellosis. Antimicrob Agents Chemoter 1994; 38 (12):2798-802.
41. Corbel MJ. Techniques in the identification and classification of *Brucella* species. In: Identification methods for microbiologists, Skinner FA & Lovelock DW, 2nd ed. London, New York, Academic Press 1979; 86-9.
42. Corbel MJ. Methods for the identification of *Brucella*. Ministry of agriculture, fisheries and food. Weybridge 1983.
43. Corbel MJ. *Brucella*, In: Bergey's manual of systematic bacteriology, vol.1. Kreig NR and Holt JG (ed), The Wilkins Co., Baltimore, Md. 1984; 377-88.
44. Corbel MJ. *Brucella*, In: Topley & Wilson's Principles of Bacteriology, virology and immunity, vol.2. Systematic Bacteriology, Parker T and Collier HL, 1990; 339-53.

45. Corbel MJ. DNA Analysis of *Brucella* Species. An Update. In: *Brucella* and Brucellosis in Man and Animals, Proceedings, FEMS Symposium, Istanbul Turkey, 1991; 24-26, 11-25.
46. Czernysheva MJ, Knjazeva EN, Egorova LS. Study of the plate agglutination test with Rose Bengal antigen for the diagnosis of human brucellosis. World Health Organisation Geneve 1977; 669-74.
47. Da Costa M, Guillou JP, Bastuji GB, et all. Specificity of six gene sequences for detection of the genus *Brucella* by DNA amplification. J Appl Bacter. 1996; 267-75.
48. Davion TJ, Delamarre J, Sallebert S, et al. Brucellome hepatique. Gastroenterol Clin Biol 1987; 11:5, 424-8.
49. Dawson-Saunders B, Trapp RG. Basic and Clinical Biostatistics. Appleton and Lange, 1990; 231-7.
50. Desmettre P, Joubert L, Valette L, Roux J. Vaccina de la brucellose humaine obtenu a' partir de la fraction phenolo-insoluble de *Brucella abortus* souche B 19. Develop Biol Standard 1984; 56, 579-86.
51. Doumboias J, Angouridaki C, Diza E, Souliou E. A study of ELISA in comparison with conventional serological methods for brucellosis. Deltion Ellinikis Mikrobiologikis Etaireias 1994; 39 (3):289-94.
52. Drankin DI, Malafeeva SL. Epidemiologija i profilaktika infekcionih zabojevanij pri profesionalnih zarazenija. Medicina, Moskva 1972.
53. Dranovskaya E. A new approach on taxonomy of brucella genus. 7 th International congress of Bacteriology and Applied Microbiology Division, Prague, Juli 3rd-8th 1994; 34.
54. Drndarski K. *Brucella* vo: Mikrobiologija i Parazitologija. Karakashevik B. 6-to izdanje, Medicinska knjiga Beograd-Zagreb, 1989; 6:36, 797-802.
55. Dubray G. Localisation cellulaire des polysides des bacteries des genres *Brucella* et *Escherichia* en phase lisse (S) or rugueuse (R). Ann Microbiol (Inst. Pasteur), 1976; 127B:133-49.
56. Efremov DG, Dimovski AJ, Jankovic L, Efremov GD. Mutant oligonucleotide extension amplification. A non labeling polimerase chain reaction assay for the detection of point mutanosis. Acta Haematol. 1991a; 85:66.
57. Efremov DG, Dimovski AJ, Efremov GD. Detection of β -thalassemia mutations by ASO hybridization of PCR amplified DNA with digoxigenin ddUTP labeled oligonucleotides. Hemoglobin, 1991b; 15:525.

58. Efremov DG, Dimovski AJ, Plaseska-Karanfilska D, Simjanovska L et al. Polymerase Chain Reaction (PCR) in: Laboratory Manual, 2nd Ed. 1998; 12-13.
59. Eissa YA, Kambal AM, Nasser MN et al. Childhood brucellosis: study of 102 cases. Ped Infect Dis J. 1990; 9 (2): 749.
60. Elberg SS. The brucella in: Bacterial and Mycotic infections of Man. Ed. RJ Dubos, Lippincott, London, 1958; 437-52.
61. Elberg SS. A guide to the diagnosis, treatment and prevention of human Brucellosis. WHO, VPH/81, 31 Rev 1, 1981.
62. Eldridge. Jane's NBC Defence Systems. 11-Ed. 1998-1999; 7-10.
63. Erski-Biljic M, Dobric D. Genus Brucella vo: Bakteriologija veterinarske medicine. Naucni Institut za Veterinarstvo Srbije, Beograd, 1998; 95-106.
64. FAO/WHO Expert Committee on Brucellosis. Sixt report. WHO, Geneva 1986.
65. Fernandes DM, Baldwin CL. Interleukin-10 downregulates protective immunity to Brucella abortus. Infection and immunity 1995; 63 (3):1130-3.
66. Flores-Castro R, Bear GM. Brucellosis (Brucella melitensis) zoonotic implications, CRS Handbook Series in Zoonoses, CRS press, INC, Florida 1979; 195.
67. Freer EN, Rojas A, Weintraub A, et al. Heterogeneity of *Brucella abortus* lipopolysaccharides. Res Microbiol, 1995; 146:596-578.
68. Gentra System. Purgene, DNA Isolation Kit. Minneapolis, USA. 2000; 15-8.
69. Gamazo C, Vitas AI, Goni LI, Diaz R, Motivon I. Factors affecting detection of *Brucella melitensis* by BACTEC NR 730, a nonradiometric system for hemocultures. Journal of Clinical Microbiology. Dec.1993; 31 (12):3200-3.
70. Gandara B, Zheludkov MM, Chernysheva MI. Evaluation of the effectiveness of laboratory methods for the diagnosis of brucellosis. Zhurnal Mikrobiologii Epidemiologii i Immunologii 1994; 0 (4):55-8.
71. Garcia RJA, Munoz BYL, Fresnadillo MJ, Trufyilland I. In vitro activities of new macrolides and rifapentine against *Brucella* spp. Antimicrob Agents Chemother 1993; 37:911-3.
72. Gazapo E, Lahoz JG, Subiza JL et al. Changes in IgM and IgG Antibody Concentrations in Brucellosis Over Time: Importance for Diagnosis and Follow-Up. J Infec Dis Feb 1989; 159 (2):219-25.

73. Gilbert DN, Moellering RC, Sande MA. The Sanford Guide to Antimicrobial Therapy, 1998; 42.
74. Golding B, Inman J, Highet P et al. *Brucella abortus* Conjugated with a gp120 or V3 Loop Peptide Derived from Human Immunodeficiency Virus (HIV) Type 1 Induces Neutralizing Anti-HIV Antibodies, and the V3-*B. abortus* Conjugate Is Effective Even after CD4⁺ T-Cell Depletion. J Virol, 1995; 3299-307.
75. Goldman L. Quantitative aspects of clinical reasoning in: Introduction to clinical Medicine, 1986; 5-7.
76. Grist NR, Emslie JA. Infections in British clinical laboratories, 1988-1989. J Clin Pathol Aug 1991; 44 (8):667-9.
77. Grassi GG. Tetracyclines-extending the atypical spectrum. International Journal of Antimicrobial Agents, Vol 3, Suppl.1 1993; 38.
78. Gupta RS. The phylogeny of proteobacteria: relationships to other eubacterial phyla and eukaryote. FEMS Microb Rew. 2000; 24(4):367-402.
79. Hall WH, Manion RE. In vitro susceptibility of *Brucella* to various antibiotics. Appl Microbiol 1970; 20:600-4.
80. Halling SM. The Organism: Genetics. 50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference. Chicago, Nov 1997; 19-25.
81. Harmon BG, Adams LG, Frey M. Survival of rough and smooth strains of *Brucella abortus* in bovine mammary gland macrophages. Am J Vet Res. 1988; 49(7): 1092-7.
82. Hernandez CR., Sahagun RA., Verdugo R A et al. *Brucella melitensis* strain 133 insertion sequence IS711. Microbiol Immunol 1998.
83. Holt G, Kreig N, Sneath P. et al. *Brucella* in: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology. Ninth ed. Williams & Wilkins, A Waverly Company, Baltimore-Philadelphia-Hong Kong-London-Munich-Sydney-Tokyo, 1994; 79.
84. Hoover D, Friedlander A. Brucellosis in: Medical Aspects of Chemical and Biological Warfare. 1998; 513-21.
85. Hussain NY, Shamaly AA. Detection of *Brucella* Species in Clinical blood samples. Report of a 12 Months experience with the Bactec 9240 in Kuwait, an Endemic Zone for *B. melitensis* infections. 7th European Congress of Clinical Microbiology and infectious diseases, Vienna /Austria March 1995; 37-8.
86. Innis AM, Gelfand DH. Optimization of PCRs in: PCR protocols-A Guide to Methods and Applications. Ed. Innis MA. Hoffman-La Roche, 1990; 2-5.

87. ...International Committee on Systematic Bacteriology Subcommittee on Taxonomy of *Brucella*. Minutes of meeting, Sept. 5, 1986; 1988; 38:450-2.
88. James P. *Brucella* spp. in: Infectious Disease. 5th Ed. 1998; 31-2.
89. Jawetz E, Melnick JL, Adelberg EA. Review of Medical Microbiology, 12th ed. Medical Publications, Los Angeles, California, 1976.
90. ...Joint FAO/WHO Expert committee of Brucellosis. Sixt report WHO, Geneva 1986.
91. ...Joint FAO/WHO, Expert Committee on Brucellosis, Fifth Report, Geneva 1971; 30-2.
92. Jumas-Bilak E, Michaux-Charachon S, Bourg G et al. Unconventional Genomic Organization in the Alpha Subgroup of the *Proteoacteria*. J Bact May 1998; 2749-55.
93. Karakashevik B. Morfologija i struktura bakterija-keliski zid vo: Mikrobiologija i parazitologija, Mediicinska knjiga Beograd-Zagreb, VI izdanje, 1989; 6:36, 41-6.
94. Kaufmann FA. Brucellosis. Maxcy-Rosenau, Public Health and Preventive Medicine, 12th Edition, Acc Norwalk, Connecticut 1987; 400.
95. Kiel FW, Khan YM. Analysis of 506 consecutive positive serologic tests for brucellosis in Saudi Arabia. J Clin Microbiol, 1987; 25 (8): 1384-7.
96. Klerk E, Anderson R. Comparative evaluation of the Enzyme-linked immuno-sorbent assay in the laboratory diagnosis of brucellosis. J Clin Microbiol 1985; 381-7.
97. Klevezas DSL, Martinez-Vazquez IO, Lopez-Merino A et all. Single Step PCR for Detection of *Brucella* spp. from Blood and Milk of Infected Animals. J Clin Microb 1995; 3087-90.
98. Kosanovik-Ketkovik D. Bruceloza-Brucellosis vo: Akutne Infektivna Bolesti, treke izdanje, Beograd 1981; 152-5.
99. Kotljarov IF, Kolos NE, Isaev IR, Hasdan ZE. Osobnosti klinicheskoy kartini pervichno hronicheskogo brucelleza v Severnom Kazahstane, Med Ref Zh 1985; 45: 2826 .
100. Krteva Lj, Caparoska S, Bosilkovski M, Damcevska J. ELISA во детекција на специфичните IgM, IgG и IgA антитела во тек на хуманата бруцелоza. I конгрес на инфектолозите на Македонија, Охрид, 1999; 53.

101. Lubani M, Sharda D, Helin I. Probable transmission of brucellosis from breast milk to a newborn. Trop Geogr Med 1988; 4, 151-2.
102. Lucero NE, Foglia L, Ayala SM, Gall D, Nielsen K. Competetive enzyme immunoassay for diagnosis of human brucellosis. J Clin Microbiol, 1999; 37 (10):3245-8.
103. Lulu AR, Araj GF, Mustafa MY at al. Human brucellosis in Kuwayt: A prospective study of 400 Cases. Q J Med New series 1988a; 34-5.
104. Lulu AR, Araj GF, Khteeb MI at al. Human brucellosis in Kuwayt: A prospective study of 400 cases. Q J Med Jan 1988b; 66 (249):39-54.
105. Madkour MM. Brucellosis in Saudi Arabia. Med J 1985; 6, 324-32.
106. Mantovani A, Prosperi S. Main zoonoses in the Mediterranean. Information Circular WHO Mediterranean zoonoses control centre, 1995; 6-10.
107. Matar GM, Khneisser IA, Abdelnoor AM. Rapid Laboratory Confirmation of Human Brucellosis by PCR Analysis of a target Sequence on the 31-Kilodalton Brucella Antigen DNA. J Clin Microbiol. 1996; 477-8.
108. Matyas Z, Jukikura T. Brucellosis as a world problem. Develop Biol Standard 1984; 56, 3-20.
109. Meyer EM. In: Animal Brucellosis. Nielson&Duncan (ed), CRC, Press.1990; 1-17.
110. Michaux-Charchon S, Bourg G, Jumas-Bilak E et al. Genome Structure and Phylogeny in the Genus *Brucella*. J Bact, May 1997; 3244-9.
111. ...Microbiology manual. Merck 1994; 70-1.
112. ...Microbiology manual. Merck 1994; 227-8.
113. Mikolich JD, Boyce MJ. Brucellosis in: Principles and Practice of Infectious Diseases 3rd ed. ed. Mendell GL et al. Churchil Livingston 1990; 1735-42.
114. Mofada SM, Eissa YA, Seed ES, Kambal AM. Isolation of Brucella melitensis from human milk. Journ Infec 1993; 26:3, 346-8.
115. Morata P, Queipo-Ortuno MI, Colmenero J. Strategy for optimizing DNA amplification in a peripheral blood PCR assay used for diagnosis of human brucellosis. J Clin Microb. 1998; 36(9):2443-6.

116. Moreno EE, Stackebrandt, Dorsch M et al. *Brucella abortus* 16S rRNA and lipid A reveal a phylogenetic relationship with members of the alpha-2-subdivision of the class *Proteobacteria*. J Bacteriol, 1990; 172:3569-76.
117. Moreno MS, Esquerdo GL, Gonzales CP at al. Diagnosis of brucellosis in an endemic area. Evaluation of routine diagnostic tests. Medicina Clinica, Apr 1992; 98 (1):481-5.
118. Moriyon I. Structure of the Cell Envelope. 50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference. Chicago, Nov 1997; 3-18.
119. Moyer NP, Holcomb LA, Hausler WJ. Brucella in: Manual of clinical microbiology. Fifth ed. Balows A, American society for microbiology, Washington DC 1991; 457-62.
120. Mukovozova AL. Azimzanova BM. Klinicheskie projavclenija hronicheskogo brucelleza. Klin Med 1987; 65,4, 111-4.
121. Murray PR, Rosental K, Kobayasi G, Pfaller M. Bacterial Morphology and Cell Wall Structure and Syntesis. In: Medical Microbiology Third ed. Mosby, 1997; 10-21.
122. Munford RS, Weavwr E, Patton C, Feely JC, Feldman AR. Human disease caused by brucela canis. A clinical and epidemiological study of two cases. JAMA, March 24, 1975; Vol 231, No 12 1267-9.
123. Namisato R, Guillen A, Arreluce M at al. Evaluacion de la prueba de Rosa de Bengala en le diagnostico serologico de brucellosis humana. Networking in Brucellosis Research, Report of the United Nations University, Edited by Frank JF, Tokyo 1991; 106-10.
124. Navaro E, Fernandez JA, Escribano J, J Clin Microbiol. 1999; 1654-5.
125. Nielsen KH, Cherwonogrodzky JW, Duncan RJ et al. Enzyme-linked immuno-sorbent assay for differentiation of the antibody response of cattle naturally infected with *Brucella abortus* or vaccinated with strain19. Am J Vet Research, 1989; 50 (1), 5-9.
126. Nielsen KH, Kelly L, Gall D, et al. Comparison of enzyme immunoassay for the diagnosis of bovine brucellosis. Prev Vet Med. 1996; 26:17-23.
127. Nikolovski B. Допринос изучавању епидемиологије, дијагнозе и клиничке слике бруцелозе. Докторска дисертација, Скопје, 1990.
128. 100. Nikolovski B. Прогностичко значење на лабораториските и клиничките наоди на текот на болеста кај лечени болни од бруцелоза. Мак Мед Прег 1991; 1-2, 30-32.

129. Nikolovski B. Можен случај на интерхумано заразување кај бруцелозата. Мак Мед Прег 1992; 1-2, 19-21.
130. Ouahrani S, Michaux S, Widada J et al. Identification and sequence analysis of IS6501, an insertion sequence in *Brucella* spp.: relationship between genomic structure and the number of *IS6501* copies. J Clin Microbiol. 1993; 139 (Pt 12): 3265-73.
131. Pellicer T, Ariza J, Foz A et al. Specific antibodies detected during relapse of human brucellosis. J Infect Dis 1988; 918-24.
132. Pavlov H, Hoghart M, McKenzie IFC, Cheers C. In vivo and in vitro effects of monoclonal antibody to Ly antigens on immunity to infection. Cell Immunol 1982; 71:127-38.
133. Pellicer T, Ariza J, Foz A, et al. Specific antibodies detected during relapse of human brucellosis. J Infect Dis 1988; 918-24.
134. Perry MB, Bundle JW, Cherwonogrodzky. The structure and serology of the A and M antigens of *Brucella abortus* and *Brucella melitensis* and the structure of polysaccharide of *Brucella* species. 14 th International Cogress of Microbiology, Manchester 1986 ; 279.
135. Petz B.Osnovne statisticke metode za nematematicare. Zagreb, 1985; 235-59.
136. Piffareti JC, Staedler P, Berreta-Piccoli CF. Risk of infection by *Brucella melitensis* for people living near infected goats. J Infect 1987; 15:177-81.
137. Polt SS, Dismukes WE, Flint A, Schaeffer J. Human brucellosis caused by *Br. canis*-Clinical features and Immune Response. Ann Int Med 1982;97: 717-9.
138. Pokrovski LV. Brucellez, Leptospiroz, Chuma-Kliniko-epidemiologicheskie aspekti, Medicina I zdravoohranenie, Moskva 1989; 1-21.
139. Printzis S, Raptopoulou GM, Koumerkeri OH et al. Immunotherapy in chronic brucellosis. Effect of levamisole and interferon: Mechanisms of action and clinical value. Immunopharmacology and Immunotoxicology 1994; 16(4):679-93.
140. Quireshi NK, Takayama U, Seydel R et al. Structural analysis of the lipid A derived from the lipopolysaccharide of *Brucella abortus*. J Endotox Res. 1994; 1:137-48.
141. Quiapo-Ortuno MI, Morata P, Ocon P et al. Rapid Diagnosis of Human Brucellosis by peripheral-Blood PCR Assay. J Clin Microbiol. 1997; 2927-30.
142. Rakel ER. Current Therapy. WB Saunders Compani, Philadelphia 1986; 37.

143. Ray WC. Brucellosis: Due to *B. abortus* and *B. suis*. CRS Handbook Series in: Zoonoses. CRS Pres, Florida 1979; Vol. 1, 99.
144. Renoux M. A pasive hemagglutination test for the detection of brucella infection. J Immunol Metods 1980; 32, 349-55.
145. Rincon SAM, Revol A, Barrera-Saldana HA. Mol Med. 1997; 3(11):734-9.
146. Robertson L, Farrell ID, Hinchliffe RA, Quaife RA. Benchbook on Brucella. Public Health Labaratory Service, Monograph Series, London 1980.
147. Roitt IM, Brostoff J, Male DK. Immunoglobulins in: Immunology, Third ed., Mosby-Year Book Europe Limited, Chikago-London-Philadelphia-Sydney-Toronto 1993; 4.1-4.11.
148. Romero C, Gamazo C, Goni IL. Detectiopn of *Brucella* spp. by PCR. 7th International Congress of Bacteriology and Applied Microbiology Division, Praque, July 1994; 19.
149. Romero C, Gamazo C, Pardo M, Goni IL. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. J Clin Microb 1995a; 33(3): 615-7.
150. Romero C, Gamazo C, Pardo M, Lopez-Goni I. Specific detection of *Brucella* DNA by PCR. J Clin Microb 1995b; 33(3): 615-7.
151. Romero C, Pardo M, Grillo MJ et al. Evaluation of PCR and indirect enzyme-linked immunosorbent assay on milk samples for diagnosis of brucellosis in diary cattle. J Clin Microbiol. 1995 c; 33(12): 3198-200.
152. ... Rosche. PCR-A revolutionary method in diagnostics. 1992; 3-15.
153. Roux J. Epidemiologie et prevention de la brucellose. Bulletin OMS 1979;57,2, 179-94.
154. Ruano G, Kidd KK. Optimizing PCR in: PCR 2 A Practical Approach. Ed. McPherson MJ. Oxford University Press, New York, USA 1995; 1-38.
155. Ruben B, Band J, Wong P, Colville. Person to person transmission of *Brucella melitensis*. Lancet 1991; 337, 14-5.
156. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB et al. Enzymatic amplifikation of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. Science, 1985; 230: 1350-4.
157. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with thermostable DNA polymerase. Science, 1988; 259: 487-91.

158. Santiago RL, Barron LC, Sanchez JL et al. Migration-affecting Lymphokines Production in Human Brucellosis. Networking in Brucellosis Research, Report of United Nations University, Edited by Frank JF, Tokyo 1991; 69-78.
159. Salle AJ. Brucella во: Основни принципи бактериологије, Медицинска књига Београд-Загреб, 1974; 623-5.
160. Schuring GG. The role of Cell Mediated Immunity in Brucellosis. Networking in Brucellosis Research, Report of the United Nations University, Edited by Frank JF, Tokyo 1991; 93-6.
161. Schuring GG. Brucellosis Vaccines: Past, Present and Future. 50th Anniversary Meeting of Brucellosis Research Conference. Chicago, Nov 1997; 26-34.
162. Shehabi A, Shakir K, el-Khateeb M et al. Diagnosis and treatment of 106 cases of human brucellosis. J Infect Jan 1990; 20(1): 5-10.
163. Sixl W, Reinthaler F, Sixl-Voigt B et al. Childhood brucellosis: a study of 102 cases. Pediatr Infect Dis J Feb 1990; 9(2):74-9.
164. Sokolovski B. Bruceloza. Skopje, 1990; 72-80.
165. Sokolovski B, Nikolovski B. Bruceloza. Skopje, 1992; 133-54.
166. Sokolovski B, Nikolovski B, Angelevski A. Бруцелозата и нејзините карактеристики во Република Македонија, Прличев, Скопје 1994.
167. Sokolovski B, Nikolovski S, Grdanovski S, Sumanov G. Хуманата бруцелоза во Република Македонија, 1980-1993 год. Мак Мед Прег 1995;1-2, 38-41.
168. Sokolovski B, Nikolovski B. Бруцелозата во: Зоонози-заболувања што се пренесуваат од животни на луѓе. Скопје, 1999; 39-56.
169. Stanik-Pavlinik B, Chech V, Mehle J. Brucellosis in spouse and the possibility of interhuman infection. Infection 11, 1983; 6, 313-4.
170. Staszkiwicz J, Lewis CM, Colville J et al. Outbreak of *Brucella melitensis* among microbiology laboratory workers in a community hospital. J Clin Microbiol Feb 1991; 29(2):287-90.
171. Stavreas NP. Review of chemotherapy for human brucellosis. Information circular-WHO Mediterranean Zoonoses Control Centre, No 32 Nov 1993; 2-3.
172. Strady A, Lienard M, Gillant JC et al. Brucella vaccination in professionally exposed subjects-Prospective study. Information Circular WHO Mediterranean Zoonoses Control Centre, No 32 Nov 1993; 3-4.

173. Stitt ER. Malta fever in: The diagnostics and treatment of tropical diseases. Fourth ed. HK Lewis and Co, LTD, London 1922; 237-45.
174. Stites DP, Stobo JD, Wels JV. Brucellosis in: Basic on Clinical Immunology, Sixt edition, Appelton, Lange 1987; 568.
175. Taleski V. Prilog kon seroloskata dijagnoza na humanata bruceloza. Procena na dijagnostickata vrednost na 2-Mercaptoethanol testot. Magisterski trud. 1996.
176. Taleski V, Sokolovski B, Panovski N et al. Assessment of the Diagnostic Value of 2-Mercaptoethanol Test in the Serologic Diagnosis of Human Brucellosis. XV International Symposium of W.A.V.M.I. Salmonellosis-Brucellosis, Cyprus, 16-27 February, 1997a; 96.
177. Taleski V. Microtechnique of 2-Mercaptoethanol Test in Serologic Diagnosis of Human Brucellosis. 8 th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Diseases. Lausanne, Switzerland, May 25-28, 1997b; 136-7.
178. Taleski V, MacMillan AP, Stack J. A Competetition ELISA for Diagnosis of Human Brucellosis. I конгрес на микробиолозите на Македонија, Охрид, 1997c; 37-8.
179. Taleski V. The Epidemiological Situation with Brucellosis in the Republic of Macedonia and the Possibilities for Using *Brucella* spp. as a Biological Weapon, International Symp CBMTS Industry I, Zagreb-Dubrovnik-Croatia, 1998; 25-31.
180. Taylor GR. Polymerase chain reaction: basic principles and automation in: PCR 1 Practical Approach. McPherson MJ, Quirke P, Taylor GR. Oxford University Press, New York, USA 1992; 1-14.
181. Tibor A, Weynants V, Deonel P et al. Molecular cloning, nucleotide sequence and occurrence of a 16.5-kilodalton outer membrane protein of *Brucella abortus* with similarity to PAL lipoproteins. Infect Immun 1994; 62:3633-9.
182. Tibor A, Saman E, de Wergifosse P et al. Molecular characterization, occurrence and immunogenicity in infected sheep and cattle of two minor outer membrane proteins of *Brucella abortus*. Infect Immun 1996; 64:100-7.
183. Todorovi K, Zarkovik B. Малтска грозница-*Brucella melitensis* во: Акутни инфективна болести са епидемиологијом, Београд 1972; 759-84.
184. Velasco J. Relaciones antigenicas y estructurales entre Ochrobactrum anthrophi and *Brucella* spp. Ph.D. Thesis, Facultad de Cienias, Universidad de Navara, Spain.1997.
185. Velimirovik B. Infectious Diseases in Europ. WHO Regional office for Europe, Copenhagen 1984; 113.

186. Velkovski K. Бруцелоза во: Општа и специјална инфектологија. Битола 2000, 154-7.
187. Verger JM, Grimont F, Grimont PAD, Crayon M. *Brucella*, a monospecific genus as shown by deoxyribonucleic acid hybridisation. Int J Syst Bacteriol, 1985; 35:292-5.
188. Vershilova AP, Dranovskaya EA, Malikov VE. Experimental study of *brucella* chemical vaccine. Develop Biol Standard 1984; 56, 553.
189. Vershilova AP. Brucellez. Medicina, Moskva 1972.
190. Vizcaino N, Cloeckert A., Zygmunt MS, DubrayG. Cloning, nucleotide sequence, and expression of the *Brucella melitensis* omp31 gene coding for an immunogenic major outer membrane protein Infect Immun, 1996; 64(9):3744-51.
191. Wallach JC, Miguel SE, Baldi PC et al. Urban outbreak of a *Brucella melitensis* infection in an Argentine family: clinical and diagnostic aspects. FEMS-Immunology and Med Microbiology. 1994; 8:1, 49-56.
192. Wendhell H. Modern Chemotherapy for Brucellosis in Humans. Rev Infect Dis. Vol 12 1990; 1060-99.
193. White RG. Immunoglobulin profiles of the chronic antibody response: discussion in relation to brucellosis infections. Postgraduate Medical Journal, Sept. 1978; 54, 595-602.
194. ...WHO. Laboratory biosafety manual, Geneva 1983.
195. ...WHO Weekly Epid. Rec. 1986; 24, 183.
196. ...WHO. Report of the WHO working group meeting on Brucellosis Diagnosis and Research in Enzyme Immunoassay. Geneva 6-7 Sept 1993.
197. Williams E. Brucellosis in humans-Its diagnosis and treatment, AP-MIS, Suppl. 1988; 3, 21-5.
198. Wood E. Brucellosis as a hazard of blood transmsion. Br Med J 1955; 1, 27-8.
199. Wright P, Nielsen KH. Current and Future Serological Mathods in: Advances in Brucellosis Research, Ed. Adams G. Library of Congress, USA.1990; 305-20.
200. Yagupski P. Detection of *Brucella melitensis* by BACTEC NR 660 blood culture system. Journal of Clinical Microbiology Aug. 1994; 32 (8):1899-901.
201. Yildimark T, Dokuzokus B, Eroglu M. *Brucella* meningitis: 5 cases. 7th European Congress of Clinical Microbiology and Infectious Disease Vienna 1995; 230.

202. Young JE. *Brucella melitensis* Hepatitis: The absence of granulomas. Ann Intern Med 1983a; 91, 3, 414-5.
203. Young JE. Human Brucellosis. Rev Infect Dis 5, 1983b; 821-4.
204. Young JE, Corbel MJ. Brucellosis: Clinical and laboratory Aspects. 1989; 13-23.
205. Young JE. Serologic diagnosis of human brucellosis. Rev Infect Dis 1991; 13 (3):359-72.
206. Young JE. Serologic diagnosis of human brucellosis: analysis of 214 cases by agglutination tests and review of the literature. Rev of Infect Dis May-Jun 1992; 13(3):359-72.
207. Zaitzeva M, Golding H, Manischewitz J et al. *B. abortus* as a Potential Candidate: Induction of Interleukin-12 Secretion and Enhanced B7.1 and B7.2 and Inter-cellular Adhesion Molecule 1 Surface Expression in Elutriated Human Monocytes Stimulated by Heat-Inactivated *B. abortus*. Inf and Immun, 1996; 3109-17.
208. Zhan Y, Kelso A, Cheers C. Differential activation of *Brucella*-reactive CD4+ T cells by *Brucella* infection or immunization with antigenic extracts. Infection and immunity 1995; 63(3):969-75.
209. Zhan Y, Cheers C. Endogenous interleukin-12 is involved in resistance to *Brucella abortus* infection. Infection and immunity 1995; 63(4):1387-90.
210. Zygmunt MS, Dubray G, Limet JN et al. Antigenic Structure of *Brucella*: Protective and Diagnostic Antigens In: *Brucella* and Brucellosis in Man and Animal, FEMS Symposium, Izmir-Turkey, 1991, 27-37.

9.-10. ПРИЛОЗИ

9.1. ELISA наоди за IgM антитела

ЗПМЗ-МИКРОБИОЛОГИЈА

Test # : 10 Date of measurement Date of calculation Measfilter: 450 nm
Testname : **BRUCELLA / IgM** Date: 14.11.2000 Date: 14.11.2000 Reffilter : 620 nm
Plate ID : F Time: 15 : 27 Time: 15 : 28
Operator : _____ Comments : _____

BLK: 0.029 NC: 0.055 PC: 1.005

QUALIFICATION MODE: NEG/ */POS

Cutoff = 0.305 = NC+0.250

Upper Limit = 0.335 = C+C*0.1

Lower Limit = 0.274 = C-C*0.1

VALIDATION

TRUE / NC<0.200

TRUE / PC>=NC+0.250

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	SMP 5	SMP13	SMP21	SMP29	SMP37	SMP45	SMP53	SMP61	SMP69	SMP77	SMP85
	0.029	3.000 POS.	Overfl. POS.	3.234 POS.	Ovrefl. POS.	Overfl. POS.	0.482 POS.	2.048 POS.	0.076 NEG.	Overfl. POS.	0.169 NEG.	0.110 NEG.
B	NC	SMP 6	SMP14	SMP22	SMP30	SMP38	SMP46	SMP54	SMP62	SMP70	SMP78	SMP86
	0.055 0.055	Overfl. POS.	Overfl. POS.	3.365 POS.	Overfl. POS.	Overfl. POS.	0.241 NEG.	1.527 POS.	0.916 POS.	2.948 POS.	0.089 NEG.	0.104 NEG.
C	NC	SMP 7	SMP15	SMP23	SMP31	SMP39	SMP47	SMP55	SMP63	SMP71	SMP79	SMP87
	0.055	0.836 POS.	3.529 POS.	3.607 POS.	3.586 POS.	Overfl. POS.	1.404 POS.	0.533 POS.	0.566 POS.	Overfl. POS.	0.106 NEG.	0.067 NEG.
D	PC	SMP 8	SMP16	SMP24	SMP32	SMP40	SMP48	SMP56	SMP64	SMP72	SMP80	SMP88
	1.005	1.863 POS.	1.172 POS.	1.918 POS.	3.675 POS.	Overfl. POS.	Overfl. POS.	3.289 POS.	0.473 POS.	0.839 POS.	1.069 NEG.	0.068 NEG.
E	SMP 1	SMP 9	SMP17	SMP25	SMP33	SMP41	SMP49	SMP57	SMP65	SMP73	SMP81	SMP89
	3.023 POS.	1.750 POS.	3.173 POS.	3.530 POS.	1.525 POS.	0.573 POS.	3.689 POS.	3.520 POS.	3.342 POS.	1.833 POS.	0.082 NEG.	0.101 NEG.
F	SMP 2	SMP10	SMP18	SMP26	SMP34	SMP42	SMP50	SMP58	SMP66	SMP74	SMP82	SMP90
	0.549 POS.	1.047 POS.	2.332 POS.	3.711 POS.	Overfl. POS.	1.179 POS.	0.225 NEG.	0.703 POS.	0.338 POS.	0.391 POS.	0.192 NEG.	0.115 NEG.
G	SMP 3	SMP11	SMP19	SMP27	SMP35	SMP43	SMP51	SMP59	SMP67	SMP75	SMP83	SMP91
	0.037 NEG.	2.094 POS.	0.541 POS.	3.007 POS.	1.337 POS.	1.347 POS.	0.994 POS.	Overfl. POS.	1.704 POS.	0.312 *	0.188 NEG.	0.062 NEG.
H	SMP 4	SMP12	SMP20	SMP28	SMP36	SMP44	SMP52	SMP60	SMP68	SMP76	SMP84	SMP92
	0.469 POS.	3.741 POS.	Overfl. POS.	1.035 POS.	Overfl. POS.	Overfl. POS.	1.973 POS.	0.060 NEG.	0.166 NEG.	0.127 NEG.	1.573 POS.	0.187 NEG.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

ID
WELL OD
OD
RESULT

STATISTICS	number	average OD	standard dev.
neg. samples :	22	0.122	0.059
gray zone samples :	1	0.312	
pos. samples :	69	1.923	1.170
total :	92	1.397	1.280

9.2. ELISA наоди за IgG антитела

ЗПМЗ-МИКРОБИОЛОГИЈА

Test # : 11	Date of measurement	Date of calculation	Measfilter: 450 nm
Testname : BRUCELLA / IgG	Date: 14.11.2000	Date: 14.11.2000	Reffilter : 620 nm
Plate ID : I	Time: 15 : 13	Time: 15 : 14	
Operator : _____		Comments : _____	

BLK: 0.018 NC: 0.048 PC: 1.181

QUALIFICATION MODE: NEG/ */POS

Cutoff = 0.298 = NC+0.250

Upper Limit = 0.328 = C+C*0.1

Lower Limit = 0.268 = C-C*0.1

VALIDATION

TRUE / NC<0.200

TRUE / PC>=NC+0.250

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	BLK	SMP 5	SMP13	SMP21	SMP29	SMP37	SMP45	SMP53	SMP61	SMP69	SMP77	SMP85
	0.018	0.851 POS.	0.682 POS.	0.968 POS.	0.644 POS.	0.846 POS.	0.845 POS.	1.121 POS.	0.980 POS.	1.221 POS.	0.444 POS.	0.643 POS.
B	NC	SMP 6	SMP14	SMP22	SMP30	SMP38	SMP46	SMP54	SMP62	SMP70	SMP78	SMP86
	0.047 0.048	1.666 POS.	1.483 POS.	1.090 POS.	0.812 POS.	1.338 POS.	1.321 POS.	0.489 POS.	1.218 POS.	0.123 NEG.	0.873 POS.	0.490 POS.
C	NC	SMP 7	SMP15	SMP23	SMP31	SMP39	SMP47	SMP55	SMP63	SMP71	SMP79	SMP87
	0.049	0.929 POS.	0.674 POS.	1.207 POS.	0.747 POS.	1.186 POS.	0.668 POS.	0.467 POS.	0.728 POS.	0.075 NEG.	0.752 POS.	0.620 POS.
D	PC	SMP 8	SMP16	SMP24	SMP32	SMP40	SMP48	SMP56	SMP64	SMP72	SMP80	SMP88
	1.181	2.012 POS.	1.152 POS.	1.365 POS.	1.206 POS.	1.179 POS.	1.216 POS.	0.578 POS.	0.230 NEG.	1.474 POS.	0.084 NEG.	0.910 POS.
E	SMP 1	SMP 9	SMP17	SMP25	SMP33	SMP41	SMP49	SMP57	SMP65	SMP73	SMP81	SMP89
	0.563 POS.	0.820 POS.	1.463 POS.	0.038 NEG.	0.480 POS.	1.206 POS.	0.727 POS.	0.549 POS.	0.158 NEG.	0.559 POS.	0.608 POS.	0.900 POS.
F	SMP 2	SMP10	SMP18	SMP26	SMP34	SMP42	SMP50	SMP58	SMP66	SMP74	SMP82	SMP90
	0.846 POS.	0.863 POS.	1.076 POS.	0.885 POS.	1.279 POS.	1.296 POS.	1.351 POS.	0.701 POS.	1.008 POS.	1.098 POS.	0.108 NEG.	0.260 NEG.
G	SMP 3	SMP11	SMP19	SMP27	SMP35	SMP43	SMP51	SMP59	SMP67	SMP75	SMP83	SMP91
	0.731 POS.	0.669 POS.	0.581 POS.	0.557 POS.	0.337 POS.	0.729 POS.	0.579 POS.	1.061 POS.	0.337 POS.	0.291 *	0.494 POS.	0.364 POS.
H	SMP 4	SMP12	SMP20	SMP28	SMP36	SMP44	SMP52	SMP60	SMP68	SMP76	SMP84	SMP92
	0.479 POS.	1.157 POS.	0.789 POS.	0.206 NEG.	1.452 POS.	0.728 POS.	0.504 POS.	1.201 POS.	0.570 POS.	0.783 POS.	0.399 POS.	0.678 POS.
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12

ID
WELL
OD
RESULT

STATISTICS	number	average OD	standard dev.
neg. samples :	9	0.142	0.076
gray zone samples :	1	0.291	
pos. samples :	82	0.885	0.345
total :	92	0.806	0.398

10.3. Подготовка на PCR Master Mix

	Вкупно (примероци x2 + 2 контроли)	X μ l	33 (14+2)	31 (13+2)	29 (12+2)	27 (11+2)	25 (10+2)
1	dH ₂ O	X 6	198	186	174	162	150
2	10 X PCR Buffer	X 2	66	62	58	54	50
3	10 X dNTP	X 2	66	62	58	54	50
4	Forward primer*	X 2	66	62	58	54	50
5	Reverse primer*	X 2	66	62	58	54	50
6	TaqMan Probe**	X 2	66	62	58	54	50
7	TaqPlatinum***	X 2	66	62	58	54	50
8	DNA	X 2	66	62	58	54	50

*Forward primer и *Reverse primer се Stock solutions (5 UM), се разредуваат 1/20 и од тоа се зема потребна количина зависно од бројот на примероци кои се испитуваат:

Вкупно (примероци x2 + 2 контроли)	33 (14+2)	31 (13+2)	29 (12+2)	27 (11+2)	25 (10+2)
	μ l	μ l	μ l	μ l	μ l
dH ₂ O	62.7	58.9	55.1	51.3	47.5
Forward primer* (Reverse primer*)	3.3	3.1	2.9	2.7	2.5
Вкупно	66	62	58	54	50

** TaqMan Probe е Stock solutions (88 UM), се разредуваат 1/10 и од тоа се зема потребна количина зависно од бројот на примероци кои се испитуваат:

Вкупно (примероци x2 + 2 контроли)	33 (14+2)	31 (13+2)	29 (12+2)	27 (11+2)	25 (10+2)
	μ l	μ l	μ l	μ l	μ l
dH ₂ O	63.7	59.9	56	52.2	48.3
TaqMan Probe**	2.3	2.1	2	1.8	1.7
Вкупно	66	62	58	54	50

** TaqPlatinum е Stock solutions (5U/ μ l), се разредуваат 1/12.5 и од тоа се зема потребна количина зависно од бројот на примероци кои се испитуваат:

Вкупно (примероци x2 + 2 контроли)	33 (14+2)	31 (13+2)	29 (12+2)	27 (11+2)	25 (10+2)
	μ l	μ l	μ l	μ l	μ l
dH ₂ O	60.7	57	53.3	49.7	46
TaqPlatinum***	5.3	5	4.7	4.3	4
Вкупно	66	62	58	54	50

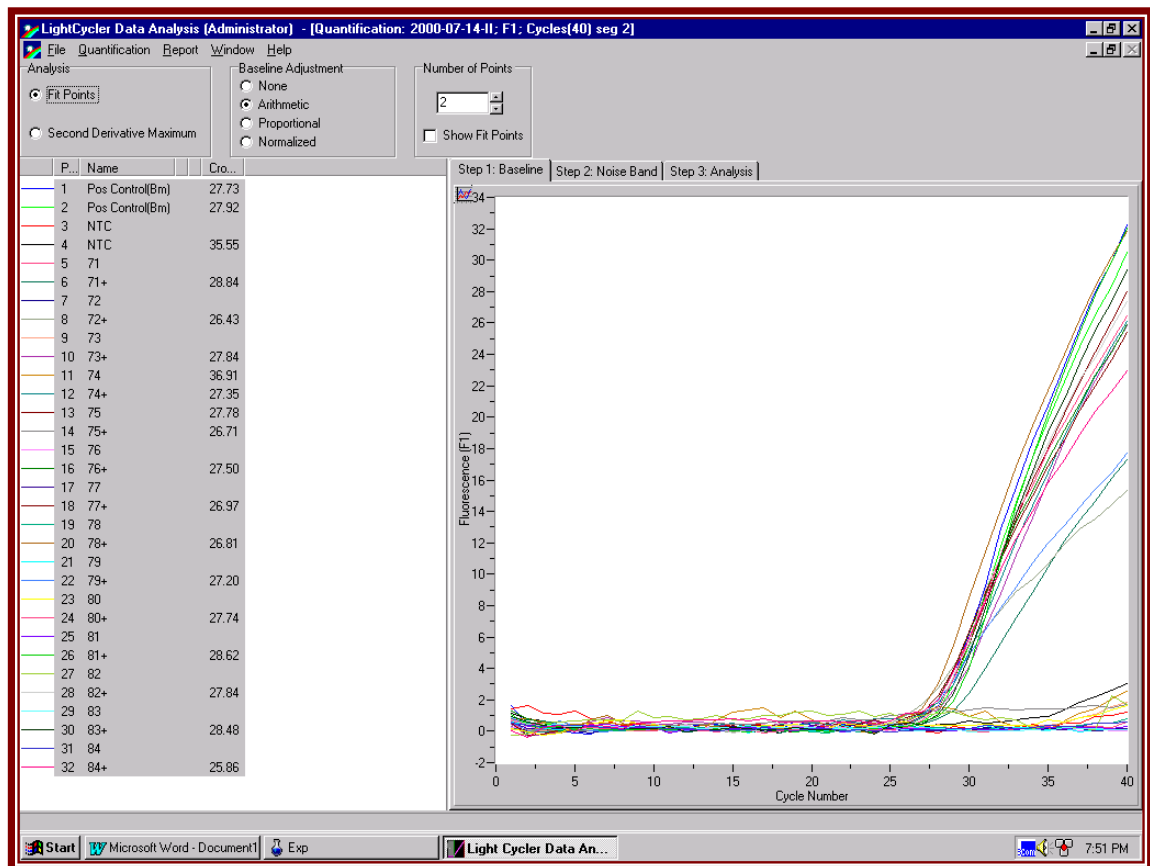
10.4. Табеларен приказ на PCR наоди

Brucella(Bm) - Organism Present						
#	Sample Name	Control	Score	Result	SSN	Enc. ID
1	Pos Control(Bm)	Positive	1130	Present		
2	Pos Control(Bm)	Positive	333	Present		
3	NTC	Negative	0	Not Detected		
5	58	Unknown	-2	Not Detected		
6	58+	Unknown	165	Present		
7	85	Unknown	-1	Not Detected		
8	85+	Unknown	326	Present		
9	86	Unknown	0	Not Detected		
10	86+	Unknown	359	Present		
11	87	Unknown	-17	Not Detected		
12	87+	Unknown	743	Present		
13	88	Unknown	-26	Not Detected		
14	88+	Unknown	372	Present		
15	89	Unknown	-4	Not Detected		
16	89+	Unknown	74	Present		
17	90	Unknown	-6	Not Detected		
18	90+	Unknown	476	Present		
19	91	Unknown	41	Present		
20	91+	Unknown	255	Present		
21	92	Unknown	-0	Not Detected		
22	92+	Unknown	259	Present		
23	93	Unknown	5	Not Detected		
24	93+	Unknown	179	Present		
25	94	Unknown	-5	Not Detected		
26	94+	Unknown	732	Present		
27	95	Unknown	12	Present		
28	95+	Unknown	368	Present		
29	96	Unknown	-0	Not Detected		
30	96+	Unknown	441	Present		
31	97	Unknown	14	Present		
32	97+	Unknown	539	Present		

Brucella - Please Repeat						
#	Sample Name	Control	Score	Result	SSN	Enc. ID
4	NTC	Negative	5	Not Detected		

SHOW GRAPH EXIT

10.5. Приказ на PCR позитивни контроли и добиени резултати



10.6. Мониторинг на флуоресценцијата кај RAPID PCR

